

**CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN XENOBIÓTICA POR MICROORGANISMOS DE
SUELOS ARROCEROS TRATADOS CON PLAGUICIDAS EN EL TOLIMA**

LUIS ALFONSO MONTOYA SÁNCHEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de
Biólogo**

Directores

JHON JAIRO MENDEZ ARTEAGA

Ph.D. Ciencias Químicas

GIANN CARLOS PEÑALOZA ATUESTA

M.Sc. Ciencias Químicas

Co-directores

ELIZABETH MURILLO PEREA

M.Sc. Química

WALTER MURILLO ARANGO

Ph.D. Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

IBAGUÉ - TOLIMA

2017



FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: Capacidad de degradación Xenobiótica por microorganismos de suelos
arroceros tratados con plaguicidas en el Toluca

AUTORES: Luis Alfonso Montoya Sánchez. Código: 070150232007

DIRECTOR: Gianni Carlos Peñaloza Atuesta

CODIRECTORES: Elizabeth Murillo Perca y Walter Murillo Arango

JURADOS: Carlos Omar Patiño Torres – Diana Paola Vargas Deigadillo

CALIFICACIÓN 4.2

☒ APROBADO

☐ REPROBADO

OBSERVACIONES _____

FIRMAS

JURADO 1

JURADO 2

Director del trabajo

Director del Programa

Ciudad y fecha: Ibague, 26 abril 2017

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
1. OBJETIVOS	14
1.1. OBJETIVOS GENERALES.....	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2. MARCO REFERENCIAL	15
2.1. ESTADO DEL ARTE.....	15
2.2. XENOBIÓTICOS.....	17
2.3. FENOL.....	18
2.3.1. Toxicidad.....	19
2.3.2. Degradación.....	21
2.3.3. Usos y aplicaciones.....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. MATERIALES.....	23
3.2. METODOLOGÍA.....	23
3.2.1. Sitios de muestreo.	23
3.2.2. Aislamientos de microorganismos.	23
3.2.3. Purificación y rotulación de las UFC (unidades formadoras de colonia).....	25
3.2.4. Cuantificación del crecimiento bacteriano por el método de McFarland.....	25
3.2.5. Montaje de bacterias.	26
3.2.6. Cuantificación del crecimiento bacteriano.	27
3.2.7. Curva de calibración para la cuantificación de fenol.....	28
3.2.8. Cuantificación de fenol.....	28
3.2.9. Identificación de bacterias promisorias para la degradación de fenol.....	29
3.3. PRUEBAS RESPIROMÉTRICAS.....	30
3.3.1. Análisis estadístico.....	31

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS SUELOS.....	33
4.2. REALIZACIÓN DE LA CURVA DE MCFARLAND.....	34
4.3. CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN CALDO LURIA...	36
4.4. CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS EN SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL.....	38
4.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FENOL.....	39
4.5.1. Valor de t calculado para la determinación de correlaciones significativas.....	42
4.5.2. La desviación estándar de la pendiente y la ordenada.....	42
4.5.3. Límite de detección	43
4.5.4. Límite de cuantificación.....	43
4.5.5. Calculo de una concentración y su error aleatorio.....	43
4.5.6. Comprobación de los límites de cuantificación y detección.....	45
4.5.7. Degradación de fenol por parte bacterias en caldo luria.....	45
4.6. DEGRADACIÓN DE FENOL EN SALES MINERALES.....	47
4.7. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON POTENCIAL BIOREMEDIADOR	49
4.8. EVALUACIÓN RESPIROMETRICA DE LA DEGRADACIÓN DE FENOL.....	53
4.9. ANÁLISIS DE LOS GRUPOS FUNCIONALES POR MEDIO DE FTIR.....	55
4.10. PROPUESTA DE DEGRADACIÓN DEL FENOL PARA LAS BACTERIAS.....	56
5. CONCLUSIONES.....	59
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	60
LOGROS.....	61
REFERENCIAS.....	62
ANEXOS.....	77

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parámetros y Métodos utilizados para la evaluación fisicoquímica de los suelos.....	24
Tabla 2. Escala de McFarland: precipitación de cada patrón frente a su correspondiente turbidez en población bacteriana.....	25
Tabla 3. Composición de los medios utilizados para el crecimiento de microorganismos y contaminados con fenol.	28
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos por sitios de muestreo.....	34
Tabla 5. Límites de confianza al 95% para los cálculos de las concentraciones de fenol y su respectivo error aleatorio.....	44
Tabla 6. Información de sensibilidad presentada para <i>S. paucimobilis</i>	53
Tabla 7. Asignación de bandas más importantes en el fenol.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estructura química del fenol.....	18
Figura 2: Compuestos fenólicos (Clorofenoles).....	21
Figura 3: Protocolo para el montaje de bacterias en medio contaminado con fenol.....	27
Figura 4: Diagrama de flujo de la metodología.....	32
Figura 5: Curva de calibración para la cuantificación de los microorganismos por el método de McFarland a 625nm.....	35
Figura 6: Crecimiento de las bacterias en caldo luria.....	36
Figura 7: Medias con intervalos LDS de 95%, que evidencian todos los crecimientos bacterianos frente a las tres concentraciones de fenol.....	37
Figura 8: Crecimiento de las bacterias en solución salina estéril.....	38
Figura 9: Medias con intervalos LDS de 95%, de los crecimientos de las bacterias frente al fenol realizadas en solución salina.....	39
Figura 10: Espectro de absorbancia para el fenol.....	40
Figura 11: Curva de calibración para la cuantificación de fenol.....	41
Figura 12: Gráfico de predicciones frente a residuos.....	41
Figura 13: Porcentaje de degradación de fenol por bacterias Caldo Luria.....	46
Figura 14: Medias con Intervalos LDS De 95%, del porcentaje de degradación de Fenol en Luria.....	47
Figura 15: Porcentaje de degradación de fenol (sales minerales).....	48
Figura 16: Medias Con Los Intervalos LDS De 95%, Que Evidencian el porcentaje de Degradación De Fenol.....	49
Figura 17: Demanda biológica de oxígeno.....	54
Figura 18: Ruta de degradación del fenol.....	58

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A: Espectros De Ir De Fenol (Azul), Solvente (Morado) Y Bacterias 204(Rojo) Y D4 (Verde).....	78
Anexo B: Diferencias Mínimas Significativas De Degradación Y Crecimiento En Caldo Luria Y Solución Salina.....	79
Anexo C: Curva de calibración para la cuantificación de fenol.....	82

RESUMEN

La industria produce gran cantidad de compuestos, con lo cual a largo plazo quedan remanentes de xenobióticos en el medio ambiente que pueden provocar cambios físicos, químicos y biológicos en el suelo. (Chong & Huang, 2012).

Dentro de estos compuestos está el fenol, el cual evidencia un efecto negativo al intervenir en el crecimiento de la biota y desarrollo de gran cantidad de organismos. No obstante, el medio ambiente tiene la capacidad de mitigar algunas afectaciones causadas por este compuesto, pero cuando se sobrepasa la capacidad de mitigación es necesario diseñar estrategias que disminuyan su carga en el ambiente. La biorremediación es una técnica utiliza las enzimas producidas por los microorganismos para degradar compuestos xenobióticos. (Mohammad y Narjes 2011).

En este estudio se aislaron 26 cepas bacterianas provenientes de suelos arroceros, de las cuales se seleccionaron, por su capacidad de crecer en medio líquido, 12 microorganismos que se expusieron a tres concentraciones de fenol (125,250, 500 ppm) durante 48h. Utilizando el método de McFarland se evaluó su crecimiento, la degradación del fenol se cuantificó directamente y se realizaron espectros FTIR para evidenciar posibles cambios en la estructura del compuesto por la acción de las bacterias. Se encontró que dos de ellas, (D4) *Sphingomonas paucimobilis* y 200(4) *Bacillus subtilis*, evidenciaron la mayor degradación de fenol sin ningún tipo de adaptación, bajo las condiciones de ensayo. El FTIR dejó ver cambios en la estructura del fenol expuesto a las bacterias.

Palabras claves: Xenobiótico. Biodegradación, Fenol, *Sphingomonas paucimobilis*. *Bacillus subtilis*, suelos arroceros.

ABSTRACT

The industry produces a large number of compounds, which in the long term remain xenobiotic remnants in the environment that can cause physical, chemical and biological changes in the soil. (Chong & Huang, 2012).

Among these compounds is phenol, which shows a negative effect when intervening in the growth of biota and development of large numbers of organisms. However, the environment has the capacity to mitigate some of the effects caused by this compound, but when the mitigation capacity is exceeded it is necessary to design strategies that reduce its load on the environment. Bioremediation is a technique used by enzymes produced by microorganisms to degrade xenobiotic compounds. (Mohammad and Narjes 2011).

In this study, 26 bacterial strains from rice soils were isolated. Twelve microorganisms that were exposed to three concentrations of phenol (125,250,500 ppm) were selected for their capacity to grow in liquid medium for 48h. Using the McFarland method, its growth was evaluated, phenol degradation was quantified directly and FTIR spectra were performed to show possible changes in the structure of the compound by the action of bacteria. It was found that two of them, (D4) *Sphingomonas paucimobilis* and 200 (4) *Bacillus subtilis*, showed the highest degradation of phenol without any adaptation, under the test conditions. The FTIR showed changes in the structure of phenol exposed to bacteria.

Keywords: Xenobiotic. Biodegradation, Phenol, *Sphingomonas paucimobilis*. *Bacillus subtilis*, rice soils.

INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo industrial, los factores antropogénicos han alcanzado un papel relevante en los cambios que pueden afectar los ecosistemas, generando la necesidad de definir cómo y en qué proporción los afectan; las investigaciones orientadas en tal dirección hacen parte de los esfuerzos para lograr un manejo sostenible de los recursos naturales que asegure su conservación (Cerón & Melgarejo, 2005).

Uno de los recursos naturales de importancia relevante es el suelo. Por constituir la capa más superficial de la corteza terrestre sirve como medio físico para el sostenimiento de la mayoría de la vida que habita en el planeta; consecuentemente en él se realizan procesos primordiales para el desarrollo de productos comestibles, farmacéuticos, materiales para el vestir y la construcción del hábitat de humanos y animales. (Cruz, Barra, Castillo & Gutiérrez, 2004).

El suelo se caracteriza por disponer de una gran capacidad nativa para mitigar la presencia de agentes contaminantes (físicos, químicos o biológicos) que puedan, de algún modo, alterar su condición natural. No obstante, en ocasiones sus mecanismos amortiguadores naturales son superados, y muchos suelos se encuentran en un nivel avanzado de afectación negativa, principalmente por sustancias de origen antropogénico (Garcés y colaboradores, 2006).

Para evaluar el impacto de los contaminantes y el potencial remediador del recurso suelo, se requiere tener presente la afectación metabólica de la comunidad microbiana que lo habita. La actividad enzimática del suelo es un indicador de salud y calidad, debido a su estrecha relación con la actividad microbiana; ésta, a su vez, es sensible a los cambios generados por contaminación y resulta dependiente de las acciones de remediación de cualquier tipo de material considerado como alterante de la composición natural del recurso suelo (Dick & Tabatabai, 1992).

Dentro de los contaminantes químicos relevantes se encuentran los productos ácidos y fenólicos liberados durante la hidrólisis microbiológica de residuos industriales y plaguicidas en el proceso de transformación a sustancias húmicas (Perucci et al. 2000). Algunas investigaciones han evidenciado que los alquilfenoles pueden provenir de la transformación de la lignina, de la modificación de derivados aromáticos oxigenados, y de los taninos; poniendo en evidencia que los fenoles se pueden encontrar naturalmente en el medio ambiente (Wilson and Hatcher, 1988).

Fenoles comunes como los cresoles y xilenoles, así como muchos fenoles polihidroxilados están presentes en el alquitrán de hulla; aparecen también en los desechos de resinas sintéticas y plásticos, gomas impermeabilizantes, aceites industriales, tintes y muchos otros productos químicos. En las prácticas agrícolas, los compuestos fenólicos son utilizados como herbicidas, insecticidas o pueden derivar de la degradación de los herbicidas clorofenoxicarboxílicos o de los insecticidas organofosforados (Lacorte and Barcelo, 1994). También se generan en la producción de agentes surfactantes por reacción con el óxido de etileno (Cerón & Ramírez, 2011).

Una de las características que identifica los compuestos fenólicos es su inestabilidad ya que están sujetos a la conversión oxidativa, mediante reacciones abióticas (aire, radicales OH^{\bullet} o nitrito, además de sufrir reacciones de fotólisis) o bióticas (fenolasas y peroxidasas provenientes de la microbiota), que los convierte en quinonas, éstas a su vez se polimerizan a macromoléculas semejantes al humus. Los suelos perturbados por este tipo de procesos evidencian altos niveles de carbono en formas recalcitrantes o humificadas, esta característica genera efectos negativos en el suelo que son difíciles de evaluar, pero que repercuten disminuyendo la producción de los suelos, aunque estos efectos si son predecibles sobre la actividad microbiana (Cerón, 2013).

La contaminación por fenoles en el medio ambiente puede alcanzar dimensiones impredecibles si se tiene en cuenta que muchos de los compuestos fenólicos, por su naturaleza química, pueden ser arrastrados por escorrentía hasta los acuíferos, resultando eventualmente afectada la población natural del recurso hídrico, entre ellos

los peces. Adicionalmente la vegetación que crece en el suelo puede también sufrir consecuencias negativas como la inhibición de la permeabilidad pasiva y el crecimiento, al absorber estos contaminantes a través de la raíz (Monroy, 2010).

Si a lo anterior se adiciona que los compuestos fenólicos, especialmente los clorinados, pueden llegar a comprometer la vida humana, aun a bajas concentraciones, se visualizan entonces consecuencias adversas para cualquier organismo vivo. Consciente de ello, la OMS categoriza a estos contaminantes como sustancias nocivas para la salud.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA), incluye once fenoles sustituidos o estructuras fenólicas como peligrosos; sus efectos sobre la salud humana causan irritación gastrointestinal inmediata, hiperventilación, acidosis metabólica, efectos neurológicos como convulsiones, shock cardiovascular, y en el peor de los casos, la muerte. A largo plazo el fenol tiene un efecto mutagénico, provocando cáncer, hepatotoxicidad, deterioros en el páncreas y músculo cardíaco (Flock, 1998).

Por lo tanto la presencia de estos agentes químicos en el suelo puede convertirse en un problema de bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena trófica con repercusiones impactantes, que llaman a la responsabilidad de todos los actores involucrados (gobernantes, entidades de salud y medioambientales, industria, investigadores, para sólo mencionar unos cuantos).

Por la razones expuestas anteriormente es posible afirmar que la productividad de un suelo agrícola depende no sólo de la calidad del mismo, en términos de textura, contenido de nutrientes y actividad biológica, sino que además debe tenerse en cuenta la presencia de agentes que alteran su condición natural, independientemente de si se trata de un contaminante físico, químico o biológico (Rouanet, 2005). Una posible solución al problema aparece a través de microorganismos con un proceso llamado “Biorremediación”.

Para contrarrestar el efecto negativo de los compuestos fenólicos se han planteado diferentes estrategias tanto químicas como biológicas; quizá la que está en su más alto furor es la biorremediación debido a su bajo costo de implementación y a su efectividad (Bollag, Mertz & Otjen1994). Se basa en la utilización de microorganismos y sus diferentes enzimas para transformar contaminantes químicos en sustancias menos activas y, en algunos casos, llegar a mineralizar los distintos compuestos, haciendo que sean menos nocivos tanto para el medio ambiente como para los organismos que lo habitan (Soudi & Kolahchi, 2011)

Este trabajo se interesó en el aislamiento de microorganismos con capacidad natural para degradar eficazmente el xenobiótico conocido como fenol, para su uso como un mecanismo prospectivo en aguas o suelos que se encuentren afectados por xenobióticos, buscando con ello implementar métodos de remediación de bajo costo, de ejecución sencilla para los agricultores y amigables con el ambiente.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVOS GENERALES

Evaluar la capacidad de los microorganismos aislados de suelos sometidos a tratamiento con plaguicidas agrícolas comerciales para degradar el xenobiótico fenol.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar los suelos cultivados con arroz sometidos durante varios periodos de tiempo a plaguicidas agrícolas comerciales, para aislar microorganismos con potencial degradador de xenobióticos.

Aislar, caracterizar e identificar microorganismos de suelos arroceros del departamento del Tolima sometidos durante varios periodos de tiempo a la acción de plaguicidas agrícolas comerciales y evaluar su capacidad para degradar xenobióticos (fenol).

Evaluar la biodegradación del fenol utilizando la técnica de FTIR.

Determinar el crecimiento de las bacterias aisladas, expuestas al xenobiótico fenol.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. ESTADO DEL ARTE

El interés de los investigadores por estudiar el impacto de los fenoles sobre diferentes ecosistemas no es un tema nuevo, las estrategias aplicadas para remediar su efecto negativo son diversas, desde hace mucho tiempo. Así por ejemplo, Jamison, Raymond y Hudson en 1969, estudiaron rutas metabólicas de cepas de *Nocordia corallina* para la degradación de varios hidrocarburos aromáticos, como método de biorremediación aplicado para minimizar el daño de estos xenobióticos. Además Mahiudddin, Fakhruddin y Abdullah en 2012, realizaron una investigación la cual se enfocó en la degradación específica de fenol utilizando *Pseudomonas fluorescens* PU1, como conclusión de este estudio se sugirió el uso de ésta bacteria en el proceso de biorremediación. Hopper y Taylor (1975), hicieron lo propio con *Pseudomona putida* para degradar m-cresol y p-cresol. Orupöld, Maširin & Tenno en 2001. Futamata, Harayama y Watanabe en 2000, sugieren que bacterias con capacidad de degradar el fenol pueden ser utilizadas en la remediación de las aguas subterráneas contaminadas con tricloro etileno.

Por su parte Kanekar, Sarnaik y Kelkar en 1998 realizaron el aislamiento de 5 cepas (*Bacillus cereus*, *Citrobacter*, *freundii*, *Micrococcus agilis* and *Pseudomona putida*) capaces de degradar fenol en concentraciones entre 368-660 mg/L.

Tziotzios y colaboradores en 2005 lograron aislar un cultivo mixto de bacterias del género *Alcaligenes* y *Acinetobacter*, que fueron adaptadas a concentraciones más bajas y expuestas a diferentes concentraciones de fenol (300-1850 ppm); se evidenció que estos organismos fueron capaces de degradar hasta 600ppm de fenol en 24h; los investigadores concluyeron que la utilización de la biorremediación es un técnica económica y eficiente en la eliminación de fenoles de aguas residuales. Otros investigadores utilizando un cultivo mixto, adaptado y capaz de degradar hasta 700ppm

de fenol, también, proponen la biodegradación de compuestos recalcitrantes de aguas residuales por microorganismos (Sudipta y Somnath, 2010).

Paraskevi, Polymenakou y Euripides en 2005 observaron como la adición de fenol como única fuente de carbono y el cambio de temperatura afectan la degradación de este compuesto, pues a temperaturas cercanas a los 30°C las bacterias del género *Pseudomona*, tienen actividad óptima en la degradación de fenol.

Bacterias como *Arthrobacter spp.*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus agilis* y *Pseudomona putida* son capaces de degradar fenol a concentraciones entre los 368-660 mg/L. (Kanekar, Sarnaik & Kelkar, 1998). Tziotzios cita a Chen *et al.*, obtuvieron remociones de 7.68g por día con concentraciones iniciales de 5000 mg/L usando cultivos puros de *Candida tropicalis*, Feitkenhauer *et al*, reportan remociones de 7g por día en un cultivo puro de *Bacillus thermoleovorans*, partiendo de una concentración inicial de fenol de 188 mg/L. Dey y Mukherjee en el 2010 realizaron una revisión de las bacterias y el intervalo de concentraciones de fenol en el cual lograron degradar la totalidad del compuesto; Hill y Robinson evaluaron la degradación del fenol por cuenta de *Pseudomona putida* en concentraciones entre 0-700mg/L, además de evaluar a *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomona fluorescens* en concentraciones 60-500ppm de fenol.

El aislamiento de microorganismos en plantas de tratamiento de agua residuales, con capacidad de degradar fenol, ha sido de gran importancia para autores como Ovin en 2003, Busca, Veeresh, Kumar, P., y Mehrotra en 2005; Fang, Lian., Zhang, y Liu en 2000; Berardinelli, Resini, y Arrighi en 2008, Cordova y colaboradores en 2008; Saravanan, Pakshirajan., y Saha en 2009; Santos, Monteiro, Braga, y Santoro en 2009; Ho, Lin, Chen, y Lee en 2009; Essam, Amin, Tayeb, Mattiasson y Guieysse, en 2010. Lee y Ho, y Chen en 2011, realizaron la misma investigación en aguas residuales, además de investigar los diferentes perjuicios del fenol en el medio ambiente, realizaron pruebas de biorremediación a distintas concentraciones de éste compuesto.

Por su parte Kaja, Aleksei y Toomas en 2001, implementaron técnicas como respirometría para medir la oxidación de compuestos fenólicos como el m-cresol, fenol, catecol, resorcinol y 5-metilresorcinol en presencia de lodos activados.

Algunos autores han enfocado sus esfuerzos en la revisión de las posibles concentraciones mínimas y máximas en las que se encuentra el fenol en aguas residuales de: refinerías (6 a 500 mg/L), operaciones de coque (28-3.900mg/L), procesamiento de carbón (9-6.800 mg/L), y la fabricación de productos petroquímicos (2,8 a 1.220 mg/L), además los fenoles provenientes de la industria farmacéutica, plásticos, productos de madera, pintura e industrias de papel los cuales se encuentran en concentraciones de (0,1-1600mg/L). Norhani y Firdausi en 2008 confirmaron el efecto inhibidor del fenol, sobre el crecimiento bacteriano a concentraciones mayores de 500ppm, indican que efluentes provenientes de la fabricación de plásticos pueden tener entre 600 y 2000 ppm de fenol además las plantas petroquímicas pueden contener de 50 a 600 ppm en sus efluentes.

2.2. XENOBIÓTICOS

Muchos de los productos orgánicos originados por las industrias poseen estructuras moleculares diferentes a los sustratos naturales, o los intermediarios metabólicos a los que están acostumbrados los microorganismos, haciendo que estas no se reconozcan por las enzimas encargadas de degradarlos y se acumulen en el medio ambiente. Estas características no naturales de los productos originados por la industria hacen que sean ajenos a la biosfera y por lo tanto son denominados xenobióticos (Chong & Huang, 2012).

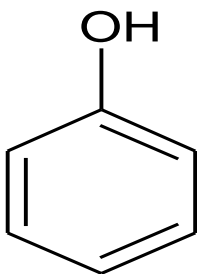
El concepto de xenobiótico puede aplicarse también a compuestos que son liberados al medio ambiente por acción del hombre, de manera que se encuentren en concentraciones más altas a las naturales (Singleton, 1994); estos compuestos pueden entrar al medio ambiente directa o indirectamente contaminándolo (Carrillo, Ruiz, & Yeomans, 2011). Es así como ciertos grupos de sustituyentes de compuestos sintéticos

tales como: halógenos, sulfo, nitro o compuestos fenólicos se acumulan y adquieren el carácter de xenobiótico (Knackmuss,1996).

2.3. FENOL

Se trata de un compuesto de naturaleza aromática, cuya estructura la conforman un anillo bencénico y un grupo hidroxilo (-OH) como único sustituyente de uno de sus hidrógenos (figura1). El grupo hidroxilo determina no sólo la funcionalidad química del compuesto sino además su reactividad. Al situarse los átomos de hidrogeno en las posiciones orto y para con respecto al grupo hidroxilo se incrementa la capacidad reactiva; así por ejemplo, con los halógenos puede producir compuestos mono-, di- y trihalofenoles (Caballero, 2000). Otra característica importante del fenol es su solubilidad, en agua es apenas 87g/L, aunque presenta una buena solubilidad en solventes como alcohol, acetona, cloroformo y éter. La mayoría de los fenoles son poco solubles en agua, consecuentemente la solubilidad de estos disminuye cuando aumenta la fuerza iónica del medio. Asimismo a medida que aumenta la cantidad de grupos hidroxilo en el anillo aromático aumenta su solubilidad, esto se hace notable en compuestos como el catecol y resorcinol los cuales presentan solubilidades a 25°C de 45g y 123g por cada 100 mL de agua, respectivamente (Muñoz, 2011). Pese a su moderada solubilidad en medio acuoso a temperatura ambiente es un cristal altamente higroscópico, lo que modifica algunas de sus propiedades físicas como el color (Muñoz, 2011). Una propiedad que identifica a los fenoles es su carácter ligeramente ácido, lo que les permite la disolución de hidróxidos permitiendo la formación de sales o iones fenoxido (Rappoport, 2004).

Figura 1: Estructura química del fenol.



Fuente: El Autor

La electronegatividad del fenol es atribuida del grupo fenilo, el cual reacciona con bases y débilmente con ácidos. De otra parte, es sensible a agentes oxidantes generando productos como la hidroquinona; además, sufre reacciones de sustitución electrofílica como halogenación y sulfonación. Este conjunto de propiedades hacen que el fenol en el ambiente reaccione con otros compuestos pero que su estructura sea difícilmente alterada, lo que lo convierte en un compuesto de compleja reactividad y por lo tanto altamente contaminante (Largo & Villamarín, 2013).

El compuesto se genera naturalmente por procesos de biodegradación de taninos y ligninas o por humificación y la degradación de proteínas, pero puede ser introducido al medio ambiente como consecuencia de la actividad industrial (preparación de antisépticos, resinas sintéticas, aceites, tintas y semejantes), apareciendo asociado con contaminantes en distintos tipos de agua y efluentes industriales (Ahumada & Gómez, 2009; Krishna et al, 2011).

2.3.1. Toxicidad. La reactividad observada en el fenol ha promovido la realización de investigaciones para probar su toxicidad en diferentes organismos, así: se ha determinado que en especies bacterianas la concentración toxica límite de este compuesto es una dosis de 64 mg/L por un tiempo de exposición de 16h la cual está relacionada con la habilidad para desnaturalizar las proteínas. Concentraciones altas de este contaminante en bacterias Gram negativas (-) genera pérdidas apreciables de iones fosfato y ATP destruyendo la estructura de la membrana (Heipieper, Keweloh & Rehm, 1991).

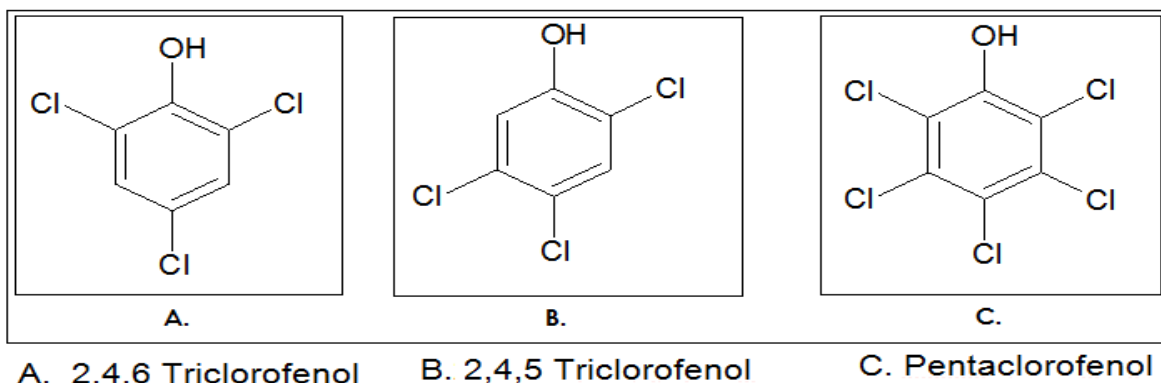
La integridad de protozoos y hongos se ve perturbada en concentraciones de la misma magnitud que para las bacterias. Los crustáceos y peces de agua dulce se ven afectados a niveles de 6-7 mg/L, pudiendo incluso ocasionar la muerte (Rodríguez, 2003). Por su parte, los mamíferos sufren toxicidad aguda en dosis que varían entre 300 a 600mg de fenol/Kg de peso corporal. En general, la exposición a largo plazo puede provocar en los animales acortamiento del tiempo de vida, problemas reproductivos, cambios en la apariencia y/o comportamiento (Rappoport, 2004). Las afectaciones en plantas van

desde falta de crecimiento hasta la muerte (U.S. Department of Health and Human Services, 1998).

En el hombre la absorción del fenol puede darse con facilidad a través de la piel, mucosas, pulmones y gastrointestinalmente, la ingestión de un 1g podría causar la muerte (Rodríguez, 2003). Los efectos que puede tener el respirar aire contaminado con fenol pueden ser, a corto plazo, irritación respiratoria, dolor de cabeza y ardor en los ojos. La exposición a altas concentraciones provoca dolores musculares, debilidad, anorexia, pérdida de peso y fatiga. Pese a que el fenol no es bioacumulable, cuando se alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en el medio ambiente, ocasionan exposiciones crónicas de bajo nivel, que puede generar cáncer respiratorio, enfermedades de corazón y efectos en el sistema inmunológico (U.S. Department Of Health And Human Services, 1998).

2.3.1. Compuestos Fenólicos. Pese a que no todos los compuestos fenólicos son tóxicos, muchos de ellos tienen efectos adversos sobre los seres vivos dentro de los que se incluyen el rompimiento de la doble hélice de ADN, aductos de ADN, mutaciones y aberraciones cromosómicas en varios sistemas de prueba; algunos inducen a lesiones precancerosas, papilomas y cánceres o actúan como carcinógenos. La agencia para la protección ambiental americana en 1991, les otorgó un valor de acuerdo a su toxicidad, los compuestos con mayor puntaje fueron pentaclorofenol, fenol, 2,4,6- triclorofenol, 2,4,5-triclorofenol y 2,4-dinitrofenol. Particularmente, los clorofenoles (figura 2) son los más tóxicos y persistentes, siendo potencialmente letales en seres humanos en dosis que van de 50 a 500mg/Kg vía oral (Caballero, 2000; Estrella et al, 2010).

Figura 2: Compuestos fenólicos (Clorofenoles)



Fuente: El Autor

2.3.2. Degradación. Producto de la alta diversidad de aplicaciones del fenol en la industria, cantidades significativas y derivados de él son arrojados al medio ambiente. Pese a que cantidades pequeñas de este compuesto son fácilmente degradadas, cuando las cantidades arrojadas son elevadas su degradación se dificulta haciendo que permanezca por un tiempo prolongado (Polymenakou & Stephanou, 2005; U.S. Department Of Health And Human Services, 1998). En el aire, pequeñas descargas de fenol son fácilmente removidas en menos de un día; en el suelo la duración es relativamente corta, por lo general se elimina entre 2 y 5 días. En el agua, el fenol puede permanecer entre una semana o más, no obstante cuando las descargas son grandes y constantes se prolongan los tiempos de degradación en aire, agua y suelo (Rappoportta, 2004).

Para inactivar los compuestos fenólicos se les puede tratar por métodos fisicoquímicos, adsorción, ósmosis inversa, oxidación electrolítica y fotocátalisis (Soudi & Kolahchi, 2012), pero su elevado costo los hace poco prácticos (Bollag, Mertz & Otjen1994). Una alternativa son los procesos biológicos, principalmente a través de microorganismos capaces de utilizar el compuesto como fuente de carbono para producir su energía. Se han reportado bacterias con capacidad de degradar el fenol, entre las que se encuentran las Gram negativas representadas en el género *Pseudomona ssp.*, otros importantes son el *Agrobacterium*, *Acinetobacteria*, *Klebsiella* y *Rhodococcus* (Polymenakou & Stephanou, 2005, Patricia & Gomez, 2009).

2.3.3. Usos y aplicaciones. El fenol es utilizado en la industria en síntesis de resinas epóxicas y fenólicas (plásticos frecuentemente utilizados en electrodomésticos), bisfenol o en la producción de anilina, alquilfenoles, xilenos, desinfectantes y productos farmacéuticos (Garcias, 2007; Rappoport, 2004), es un componente clave para la elaboración de pesticidas, fungicidas, herbicidas, así mismo es utilizado en el tratamiento de subproductos del blanqueo de pulpa de papel (Colin Flock, 1998).

Algunos compuestos fenólicos pueden funcionar como derivados de hormonas interactuando con el sistema hormonal humano, por ejemplo el bisfenol A es un factor de decrecimiento de esperma en varones y de aparición de cáncer de mama en mujeres (Bravo, 1998).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

El fenol y los demás reactivos utilizados en este trabajo fueron grado analítico, marca Merck. Las sales y medios utilizados fueron grado reactivo.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Sitios de muestreo. Se trabajó con suelos seleccionados de acuerdo a su uso agrícola (cultivos de arroz), con un mínimo de 7 años de manejo y a su ubicación (exclusivamente en el departamento del Tolima); sin olvidar que en todos los casos el cultivo estaba sometido a la acción de herbicidas de diferente naturaleza. Con estos criterios se procedió a la toma de la muestra de suelo (capa superficial, 0-10 cm en donde se encuentra la mayor cantidad de microorganismos), la cual se identificó debidamente y se transportó al laboratorio para el posterior análisis microbiológico (Campbell, 2007).

3.2.2. Aislamientos de microorganismos. Utilizando 6 tubos de ensayo, se agregó 9 mL de agua estéril a cada uno; al primero de ellos se adicionó 1 gramo de suelo, esta dilución será de 10^{-1} mg/mL. La mezcla se agitó en un vortex (1 min), sin permitir que las partículas en dispersión precipiten, se tomó 1 mL de la mezcla y se llevó a un nuevo tubo que contenía 9 mL agua estéril, obteniendo así una dilución de 10^{-2} ; el proceso se repite en la misma forma para obtener diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} (Tortora, 2007).

Se prepararon 6 cajas de Petri con 15 mL de agar nutritivo (Anexo C) y ketoconazol al 0,2%, utilizado como antifúngico, las cuales se esterilizaron previamente. Para incrementar la probabilidad del aislamiento de una única colonia se trabajó con las diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} . Se prepararon tres réplicas de cada una de las diluciones seleccionadas, se tomó 1 mL de cada una y se esparció de manera homogénea sobre

una de las cajas de Petri. Posteriormente se llevó a incubadora a 37°C por un periodo de 24 horas.

Las condiciones del sitio de muestreo se evaluaron fisicoquímicamente usando los parámetros y pruebas que muestra la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros y Métodos utilizados para la evaluación fisicoquímica de los suelos.

Parámetro	Método analítico
pH	Suspensión Ac*. 1:1 Potenciométrico
Materia Orgánica	Walkley – Black
Fosforo	Bray – Kurts II - Espectrofotométrico
Potasio	NH ₄ O AC*- Absorción atómica
Hierro	Doble acido Absorción atómica
Magnesio	Doble acido Absorción atómica
Arcilla	Bouyoucos
Limo	Bouyoucos
Arena	Bouyoucos

*AC: acida

Fuente: El autor

3.2.3. Purificación y rotulación de las UFC (unidades formadoras de colonia). Se realizó el aislamiento de UFC, provenientes de las cajas de Petri con diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} , seleccionando aquellos microorganismos con características morfológicas claramente diferenciables (forma, elevaciones, margen etc.), se realizaron repiques sucesivos por agotamiento en medio agar nutritivo hasta asegurar que el cultivo fuera totalmente puro. Los microorganismos aislados se mantuvieron en agar nutritivo a una temperatura de 5°C hasta su utilización en las determinaciones analíticas. Las bacterias con características morfológicas diferentes fueron rotuladas con los números 200, 201, y 303 correspondientes al Municipio de Prado, las bacterias procedentes del Municipio de Alvarado fueron identificadas con la letra D (Doyare) y un número para cada colonia diferente (D1, D2...D12).

3.2.4. Cuantificación del crecimiento bacteriano por el método de McFarland. Se elaboraron 11 estándares con las cantidades de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y H_2SO_4 indicadas en la tabla 2, cada concentración equivale a un número determinado de microorganismos (UFC/mL) los cuales se muestran en la última columna.

Tabla 2. Escala de McFarland: precipitación de cada patrón frente a su correspondiente turbidez en población bacteriana.

Número de la turbidez estándar	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(\text{mL})$	H_2SO_4 1% (mL)	UFC/mL
0,5	00,5	9,95	1×10^8
1	0,1	9,9	$3,0 \times 10^8$
2	0,2	9,8	$6,0 \times 10^8$
3	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
4	0,4	9,6	$1,2 \times 10^9$
5	0,5	9,5	$1,5 \times 10^9$
6	0,6	9,4	$1,8 \times 10^9$
7	0,7	9,3	$2,1 \times 10^9$
8	0,8	9,2	$2,4 \times 10^9$
9	0,9	9,1	$2,7 \times 10^9$

Número de la turbidez estándar	BaCl ₂ .2H ₂ O(mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	UFC/mL
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

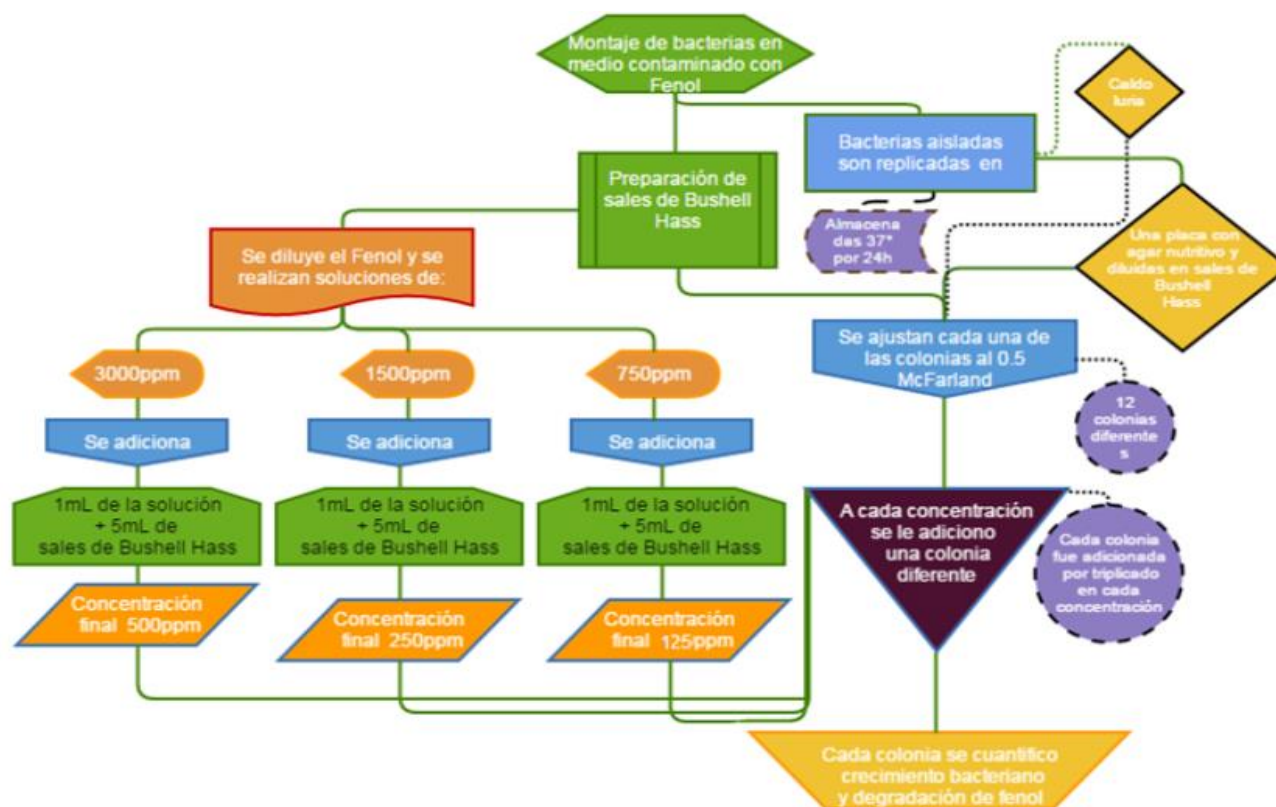
Fuente: Organización Mundial de la Salud- 2004

3.2.5. Montaje de bacterias.

A las bacterias utilizadas en este estudio no se les realizó el proceso de adaptación, puesto que se quería conocer cuáles eran las condiciones naturales para degradar el fenol.

El proceso de adaptación hace referencia a la exposición a largo plazo de una comunidad bacteriana a sustratos de carbono (para este caso fenol), causando en estas una respuesta de adaptación a las nuevas condiciones. Estas respuestas pueden ser evidenciadas en un mejor crecimiento de las bacterias o una mayor degradación del xenobiótico causada por la inducción de enzimas que no estaban presentes o que estaban presentes en una baja cantidad (Spain, Pritchard, & Bourquin, 1980; Shimp & Pfaender, 1985; Jiménez, 1996).

Figura 3: Protocolo para el montaje de bacterias en medio contaminado con fenol.



Fuente: El autor

3.2.6. Cuantificación del crecimiento bacteriano. La cuantificación del crecimiento bacteriano se realizó tomando 4 mL de la muestra a analizar y se leyó a una absorbancia de 625nm (Espectrofotómetro Evolution 260 bio).

Se utilizan 5 mL de las sales de Bushell–Hass (Anexo C), 1mL de la solución de fenol diluidas en agua a 3000, 1500 y 750ppm para cada caso, para obtener una concentración final de 500, 250 y 125ppm respectivamente (figura3).

Se agregan 0,5mL del medio en que se han puesto las bacterias para su crecimiento, ya sea caldo Luria (Anexo C), utilizados como blanco o 0,5ml de solución salina estéril (figura3).

La cantidad de bacterias se calculó extrapolando los datos de las absorbancias en la curva de calibración obtenida por la escala de McFarland. Todas las lecturas de las muestras se realizaron por triplicado.

3.2.7. Curva de calibración para la cuantificación de fenol. La curva de calibración para la cuantificación de fenol se realizó mediante la preparación de una solución madre de 1000 ppm (a 500 mL de agua destilada estéril, se le agregó 500mg de Fenol), a partir de esta solución madre se prepararon por triplicado nueve diluciones entre 0,5 a 1000 ppm y se determinaron las absorbancias respectivas a 269 nm. La aplicación de parámetros estadísticos permitió establecer, bajo las condiciones del ensayo, la linealidad del método en un rango de 1 a 100ppm, el cual fue seleccionado para la cuantificación del análisis.

3.2.8. Cuantificación de fenol. Se tomó una alícuota 1 mL de la muestra previamente filtrada (membrana de Scheleicher & Schuell, tamaño de poro de 0,2 μ m), se realizó una dilución 1:10 con agua destilada en un balón aforado y posteriormente se leyó en el espectrofotómetro UV-VIS (269 nm), bajo las mismas condiciones de los estándares. La concentración de fenol se calculó extrapolando las lecturas de absorbancia en la curva. Todas las muestras se determinaron por triplicado. Como blanco se tomó 5mL de las sales de Bushell–Hass, en lugar de fenol se tomó 1,0 mL de agua y 0,5mL del medio utilizados para el crecimiento de microorganismos y contaminados con fenol (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de los medios utilizados para el crecimiento de microorganismos y contaminados con fenol.

SOLUCION	VOL.* DE LA SOLUCION (mL)	SALES (ml)	VOL.* FINAL (ml)	Concentración FINAL (mg/L)	M.O.* (ml) luria	M.O.* (ml) SOLUCIÓN SALINA
3000ppm	1	5	6	500	0,5	
1500ppm	1	5	6	250	0,5	
750ppm	1	5	6	125	0,5	
3000ppm	1	5	6	500		0,5
1500ppm	1	5	6	250		0,5

SOLUCION	VOL.* DE LA SOLUCION (mL)	SALES (ml)	VOL. * FINAL (ml)	Concentración FINAL (mg/L)	M.O.* (ml) luria	M.O.* (ml) SOLUCIÓN SALINA
750ppm	1	5	6	125		0,5

*M.O.= Microorganismo AJUSTADO 0.5 DE Macfarlán * = Volumen

Fuente: El autor

Se realizaron controles para cada una de las concentraciones establecidas en la tabla 3, en los cuales se reemplazó el volumen del inóculo por la cantidad de medio de crecimiento de las bacterias utilizado en cada caso.

Para la determinación de la cantidad de fenol degradado se llevó a cabo el siguiente algoritmo:

$$Fd = Fi - Fr$$

Dónde: **Fd**: Fenol degradado **Fi**: Fenol inicial **Fr**: Fenol remanente

La información se complementó determinando el espectro FTIR de las muestras, para ello se reunieron las tres réplicas de cada concentración, se agregaron 5mL de diclorometano y 4g de NaCl, se dejó reposar durante 12 h, posteriormente se extrajo la fase del diclorometano y se procedió a realizar el espectro FTIR en donde se coloca la muestra en medio de dos celdas de NaCl.

3.2.9. Identificación de bacterias promisorias para la degradación de fenol. Se utilizaron pruebas bioquímicas convencionales (tinción de Gram, características morfológicas, catalasa etc.) para identificación de los microorganismos con mayor capacidad de degradación y crecimiento en los medios que contenían fenol (Garrity, Bell & Lilburn, 2004). Los resultados se confirmaron mediante el método automatizado VITEK 2 para los bacilos Gram negativos y mediante sistema de identificación comercial BD BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID (Becton Dickinson) para la identificación de bacilos Gram positivos.

El sistema VITEK 2 Compact responde a necesidades de análisis de laboratorios para el estudio de cepas significativas aisladas de muestras clínicas, de aguas, alimentos y suelos, para una identificación microbiana rápida y precisa (Romeu *et al.*, 2010).

VITEK 2 Compact es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad (Romeu *et al.*, 2010). En el presente trabajo se realizó el test de sensibilidad a bacterias Gram negativas con forma de bacilo.

VITEK está constituido por un inoculador/sellador que permite la inoculación de las tarjetas en pocos minutos, una incubadora/lector que asegura simultáneamente la incubación y la lectura de las tarjetas para una capacidad que varía de 32 a 480 tarjetas según el modelo. El ordenador equipado con los programas de VITEK efectúa un control permanente de las operaciones en curso, memoriza los valores, trata e interpreta los resultados (Biomerieux, tomado de: http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?doc=SPN_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_7#)

3.3. PRUEBAS RESPIROMÉTRICAS

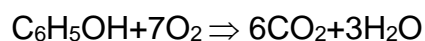
Las pruebas respirométricas permiten evaluar indirectamente la degradación de una sustancia en donde se evalúa el consumo de oxígeno y producción de CO₂. Este tipo de pruebas son un método utilizado para evaluar la actividad microbiana ya que permiten inferir sobre el metabolismo activo de los microorganismos ante el contaminante (Aumada & Gomez, 2009).

El montaje se ejecutó de la siguiente manera: se realizó una solución madre en sales de Bushell–Hass que contenía fenol a 500ppm, esta fue servida así: En una botella de OxiTop (WTW) se adiciono 89.53mL de la solución antes descrita y 7.46 mL del

microorganismo ajustado 0.5 a la escala de McFarland para un volumen final de 97mL. En otra botella OxiTop (WTW) se procedió igual a la anterior solo se cambió el fenol por una cantidad igual de glucosa, ya que en este ambiente daría una lectura máxima del crecimiento bacteriano. Con el fin de tener un testigo o punto de referencia. En una tercera botella, se adicionó el mismo volumen de medio pero se reemplazó el volumen de la bacteria por solución salina estéril tomándose esta botella como blanco. Todo el ensayo se realizó por duplicado y se dejó por 5 días a una temperatura de 24 °C.

Los organismos que presentaron un mayor crecimiento bacteriano y habilidad degradadora del fenol estadísticamente significativa en relación a las demás ($p < 0,05$), se seleccionaron para realizar con ellos una prueba respirométrica.

Para los cálculos del consumo de oxígeno se tomaron los valores obtenidos por el OxiTop (WTW) y se multiplicaron por 20, el cual corresponde al factor para la alícuota tomada, según especificaciones del fabricante. Los valores obtenidos fueron reemplazados en la ecuación:

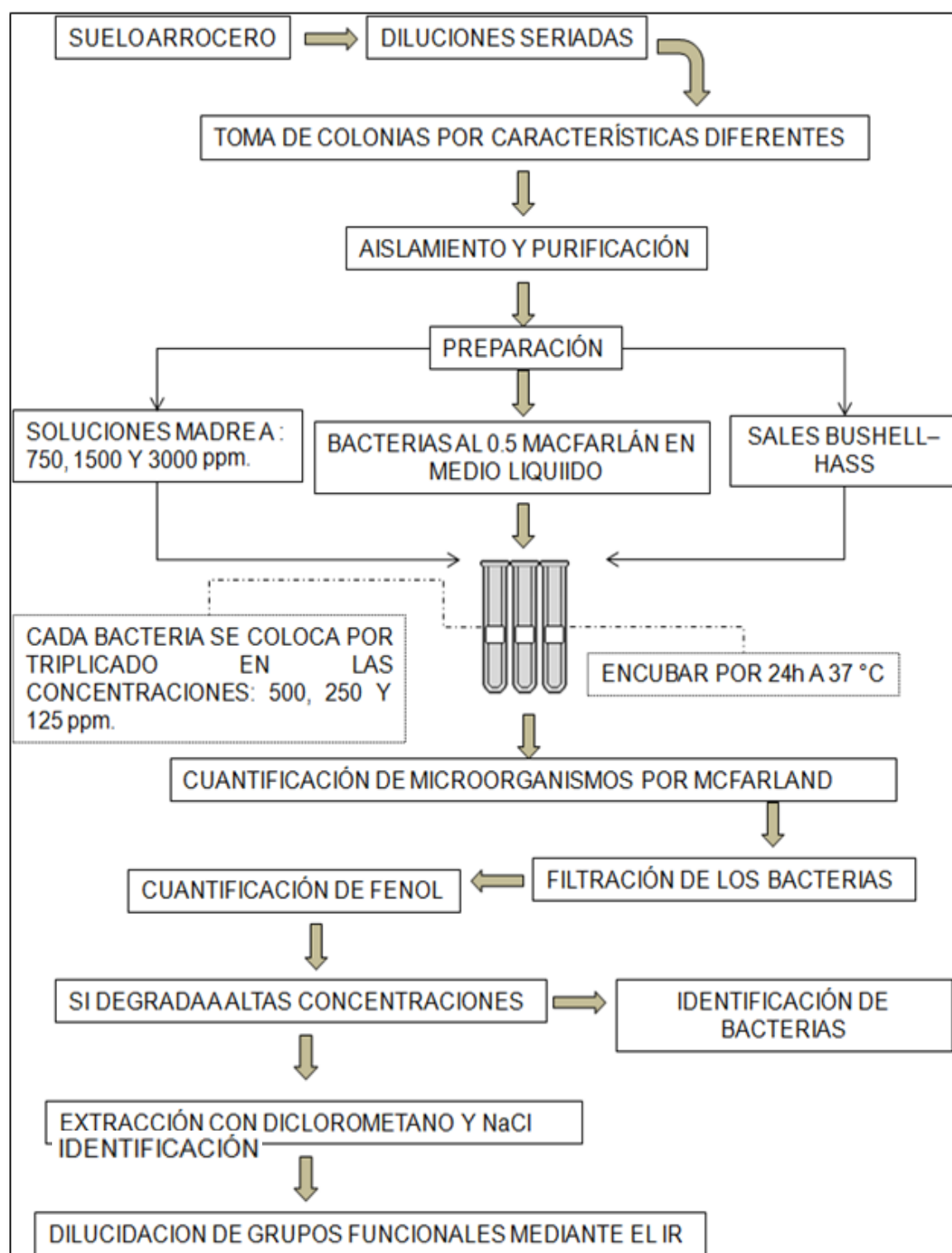


Y fueron comparados con el fenol remanente obtenido de la prueba. La figura 4 muestra la metodología aplicada en forma resumida.

3.3.1. Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion 2,0, se realizó una ANOVA con un nivel de significancia del 95%. Los resultados logrados en el crecimiento de las bacterias y la degradación del fenol se compararon mediante pruebas de múltiples rangos de Fisher.

Para la validación de la metodología de cuantificación de fenol, se implementaron parámetros estadísticos como: linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad (Díaz de Armas et al. 1998).

Figura 4: Diagrama de flujo de la metodología.



Fuente: El autor

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS SUELOS

Las fincas en las que se realizó la colecta corresponden al departamento del Tolima, la primera en el municipio de Prado, vereda catalán, finca Potosi, con coordenadas 3°46'40.4"N 74°57'31.52"W, la segunda finca pertenece al municipio de Alvarado, finca Doyare con coordenadas 4°35'14.1"N 74°55'27.1"W.

A pesar de la gran brecha geológica que existe entre las dos fincas en las que se hizo la recolección de suelo, las características fisicoquímicas de los suelos son bastante similares como lo muestra la tabla 3. Se destaca la escasa cantidad de materia orgánica que poseen, con valores iguales, para el caso del suelo Potosi, o por debajo del 2% para el caso del suelo de proveniente de Prado (tabla 4), lo cual concuerda con lo dicho por Rojas & Moreno, 2008, quien añade que son pobres nutricionalmente lo que conlleva a que estos sean pobres biológicamente.

Un factor determinante para el desarrollo de los microorganismos en el suelo, es el pH, puesto que en general valores extremos tienen efectos inhibitorios sobre los microorganismos y los procesos de degradación (Dibble, & Bartha, 1979), las bacterias aisladas en este trabajo provienen de un suelo levemente ácido (6,4) como en el caso del proveniente de Alvarado, o ácido (5,6) como es el caso del suelo de Prado (tabla 3). Brindando los dos un pH óptimo para la realización de las pruebas.

A través de encuestas realizadas a los encargados se pudo conocer sobre los manejos realizados en estos y el tipo de cultivo establecido. Se encontró que los suelos eran de uso exclusivo al cultivo del arroz, sin rotación de cultivo ni periodos de descanso para el suelo; además, es frecuente la utilización de diferentes agroquímicos antes, durante y después de cada cosecha, lo cual ha hecho de estos terrenos un ambiente propicio para el desarrollo de algunos grupos bacterianos.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos por sitios de muestreo.

Prueba	Potosi	Prado
pH	5,6	6,4
Materia Orgánica	2%	1,7 %
Fósforo	100 mg/Kg	77 mg/Kg
Potasio	0,65 meq/100 g	0,16 meq/100
Hierro	36 mg/Kg	69 mg/Kg
Magnesio	2,6 meq/100 g	3,1 meq/100 g
Arcilla	22,5 %	20,5 %
Limo	18%	16%
Arena	59,5 %.	63,5 %.

Fuente: El autor

En total se utilizaron 26 microorganismos, 12 de ellos fueron aislados del municipio de Alvarado, finca Doyare; los 14 restantes hacen parte de la colección del laboratorio de microbiología del grupo de investigación en productos naturales de la Universidad del Tolima (GIPRONUT) y fueron aislados en el municipio de Prado, finca Potosi.

4.2. REALIZACIÓN DE LA CURVA DE MCFARLAND

Para cuantificar la cantidad de microorganismos se realizó una curva de calibración conforme se muestra en la figura 5, cada una de las soluciones se realizó por triplicado y se leyeron a una longitud de onda de 625nm en un espectrofotómetro (Evolution 260 bio). Los valores obtenidos para la ecuación de la recta fueron los siguientes:

$$y = 0,196x + 0,0937$$

Los valores para r, y error fueron:

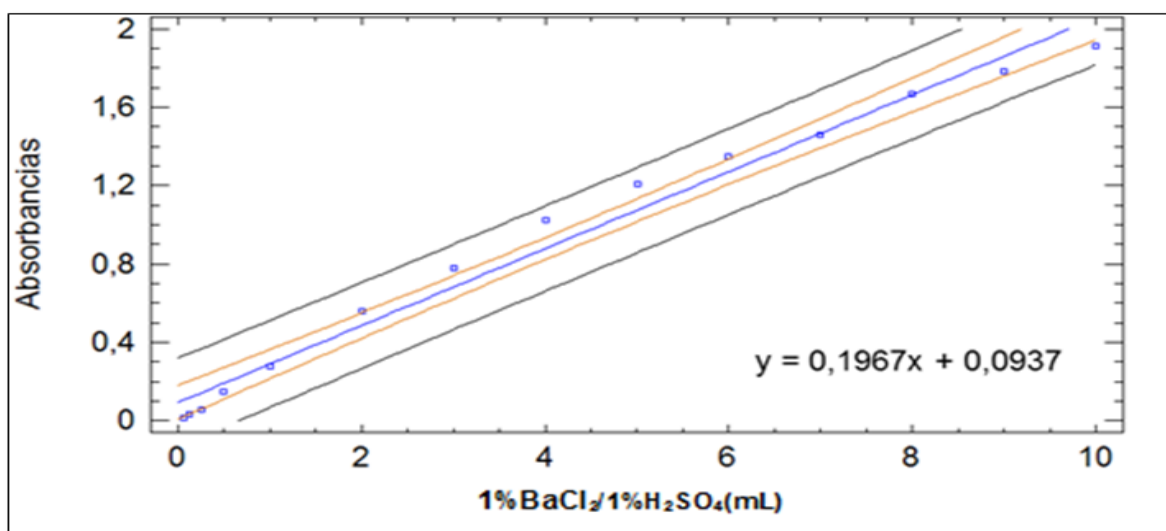
$$r = 0.99$$

$$R^2 = 0.98$$

$$\text{Error} = 0,09$$

De los 26 microorganismos aislados mencionados con anterioridad, teniendo en cuenta su capacidad de crecimiento en los medios de cultivo líquidos, se seleccionaron 12 microorganismos dentro de los cuales se encuentra *Pseudomona aeruginosa* (PSE), la cual hace parte de la colección de GIPRONUT y se utilizó como referencia debido a la capacidad que tiene esta bacteria para degradar distintos contaminantes como el fenol, y porque ya ha sido evaluada su capacidad degradativa (Rangel, Rodríguez, Garza & Martínez 2010).

Figura 5: Curva de calibración para la cuantificación de los microorganismos por el método de McFarland a 625nm.



Fuente: El autor

En la figura 5 se muestra una alta relación entre 1%BaCl₂/H₂SO₄(mL) y absorbancia ajustándose está a un modelo lineal, a un nivel de significancia del 95%.

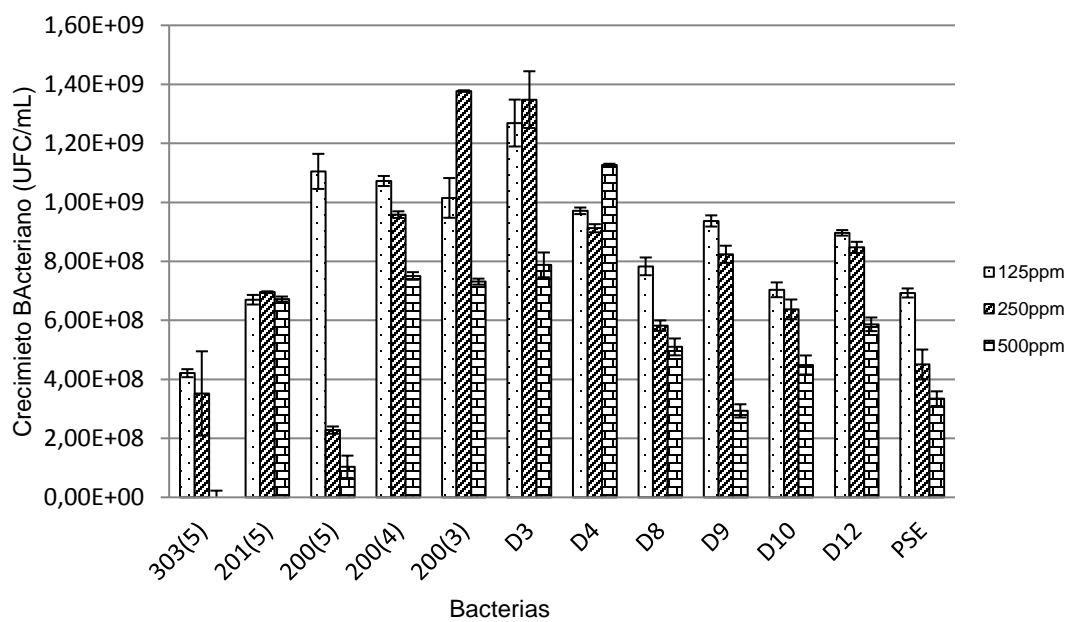
Después de verificar los parámetros de la curva se procedió a realizar el protocolo que se observa en la figura 3, los resultados de la absorbancia fueron extrapolados en la ecuación de la recta:

$$y = 0,196x + 0,0937$$

4.3. CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN CALDO LURIA

En la concentración de 500 ppm, la bacteria que más creció fue la identificada como D4 con un crecimiento de $1,1 \times 10^8$ UFC/mL seguida de las bacterias D3 y 200(4); pese a que no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas si lo revelaron frente al resto de microorganismos. Sus crecimientos fueron de $7,866 \times 10^8$ y $7,5 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente (figura 6).

Figura 6: Crecimiento de las bacterias en caldo luria.

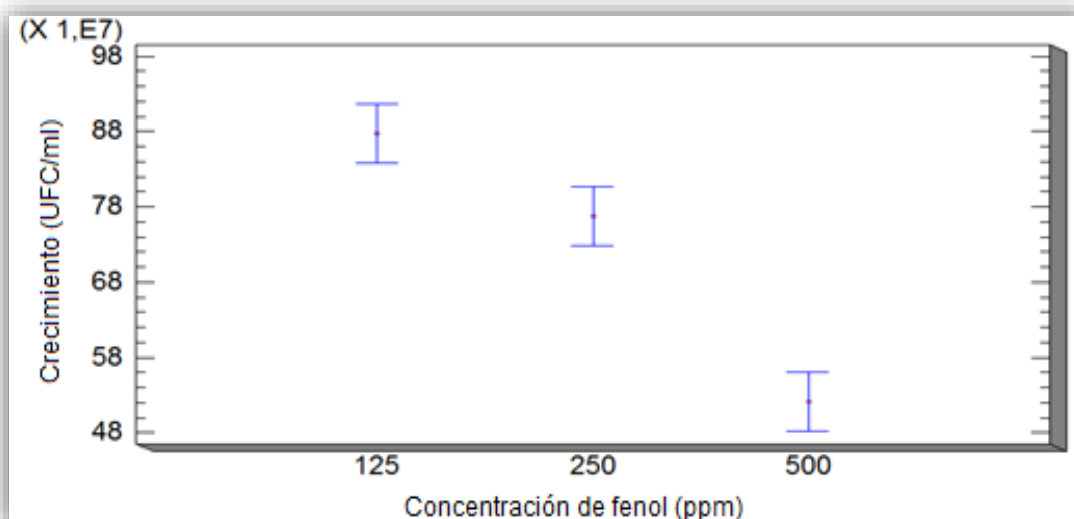


Fuente: El autor

En la figura 6 se puede observar como el mayor crecimiento bacteriano en la concentración 250 ppm de fenol lo lograron las bacterias identificadas como D3 y 200(3) con un valor promedio de $1,3766 \times 10^9$ y $1,3466 \times 10^9$ UFC/mL.

La bacteria que presentó el mayor crecimiento en un tiempo de 48h en el medio que contenía 125ppm de fenol fue la D3, con crecimiento promedio $1,27 \times 10^9$ UFC/mL presentando diferencias significativas sobre el resto de microorganismos (Figura 6).

Figura 7: Medias con intervalos LDS de 95%, que evidencian todos los crecimientos bacterianos frente a las tres concentraciones de fenol.



Fuente: El autor

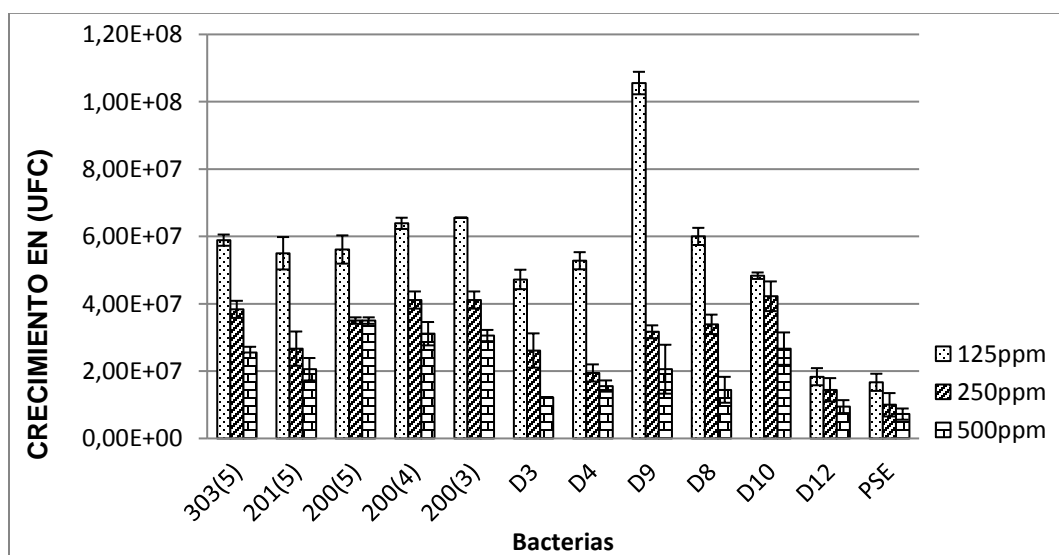
En la figura 7 se agruparon los crecimientos de todas las baterías en cada una de las concentraciones, el ANOVA mostró que existe diferencia significativa ($p= 0,000$) en el crecimiento de los microorganismos para las tres concentraciones evaluadas, donde se observa una reducción significativa del crecimiento promedio de las bacterias con el aumento de la concentración, lo cual guarda relación directa con la disminución de la actividad metabólica de los microorganismos, causada por el aumento de las concentraciones del fenol (Argüello, 2001). En bacterias Gram negativas el fenol genera pérdidas significativas de metabolitos tales como ATP e iones de potasio, además de esto puede destruir la estructura de la membrana y/o interferir con las reacciones celulares como fosforilación oxidativa o incluso inhibir directamente fenol permeasas o hidrolasas vinculadas al metabolismo (Argüello, 2001).

4.4. CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS EN SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL

Al comparar los crecimientos de las bacterias en caldo luria (figura 6) y solución salina (figura 8), los crecimientos de las bacterias se ven drásticamente disminuidos en la solución salina, ya que el medio luria proporciona una fuente adicional de carbono a los microorganismos permitiendo un mayor crecimiento de estos. La figura 8 muestra como las bacterias 200(5), 200(4) y 200(3) presentaron el mayor crecimiento promedio ($3,5 \times 10^7$, $3,1 \times 10^7$ y $3,05 \times 10^7$ UFC/mL respectivamente) en la concentración de 500ppm de fenol.

En la concentración 250 ppm de fenol las bacterias D10, 200(3), 200(4) y 303(5) presentaron el mayor crecimiento promedio, no exhibieron diferencias estadísticamente significativas entre estas, pero si frente al resto de bacterias, sus valores fueron $4,22 \times 10^7$, $4,11 \times 10^7$, $4,11 \times 10^7$ y $3,83 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente (figura 8). Con una diferencia estadísticamente significativa se puede afirmar que la bacteria que más creció en la concentración de 125 ppm fue la D9 con un crecimiento promedio de $1,05 \times 10^8$ UFC/mL como lo muestra la figura 8.

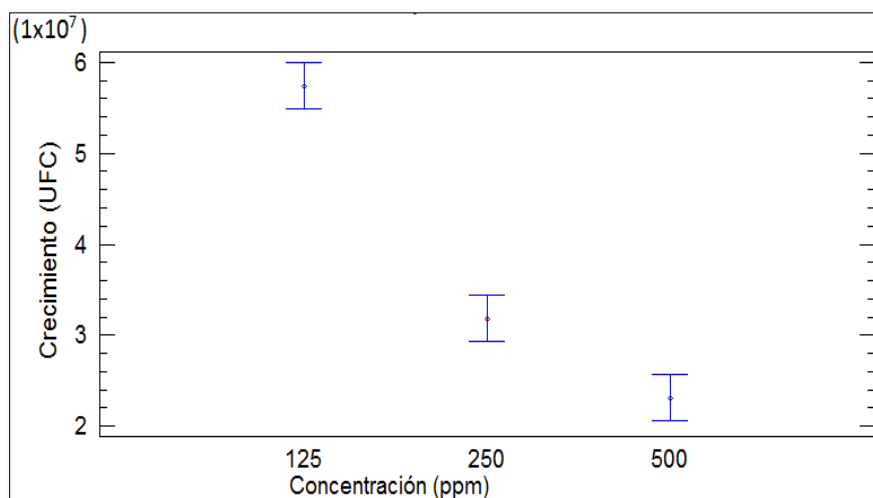
Figura 8: Crecimiento de las bacterias en solución salina estéril.



Fuente: El autor

En la figura 9 la ANOVA mostro diferencias significativas entre las tres concentraciones ($p=0,000$), a medida que aumentan las concentraciones de fenol disminuye el crecimiento de las bacterias.

Figura 9: Medias con intervalos LDS de 95%, de los crecimientos de las bacterias frente al fenol realizadas en solución salina.



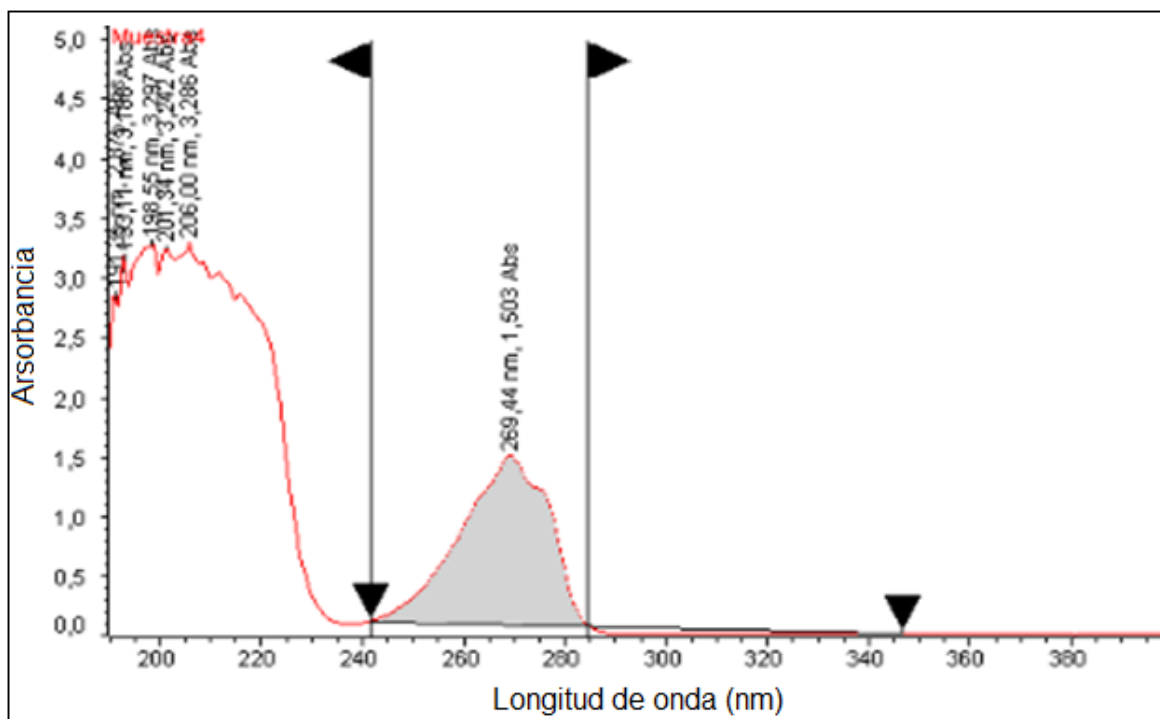
Fuente: El autor

4.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FENOL

Para la evaluación de la capacidad de degradación, estas bacterias aisladas de suelos arroceros se expusieron a un medio que contenía fenol, para lo cual era necesario cuantificarlo. Para emitir resultados que proporcionen un alto grado de confianza se realizó la validación del método; los resultados fueron los siguientes:

Se realizó un barrido en el espectrofotómetro UV-VIS para determinar la longitud onda de máxima absorbancia del fenol, se obtuvo que el fenol absorbe a diferentes longitudes de onda, pero la longitud de 269,44 nm es donde lo realiza con mayor intensidad y sin ningún tipo de interferencia aparente (figura 10).

Figura 10: Espectro de absorbancia para el fenol.



Fuente: El autor

Los resultados de la curva del fenol frente a la absorbancia con los puntos 0,5; 1, 2, 4, 10, 20, 40, 100, 200, 400 y 1000 ppm muestran cómo se cumple con la linealidad solo hasta la concentración de 100ppm (Anexo C), por esta razón se tomó solo hasta este punto, para realizar la validación de la curva para la cuantificación del fenol.

Para la realización de curva de calibración se tomaron los puntos 0,5; 1, 2, 4, 10, 20, 40, 100ppm de fenol, para los cuales se determinó su respectiva absorbancia (figura 11) y determinaron los siguientes parámetros:

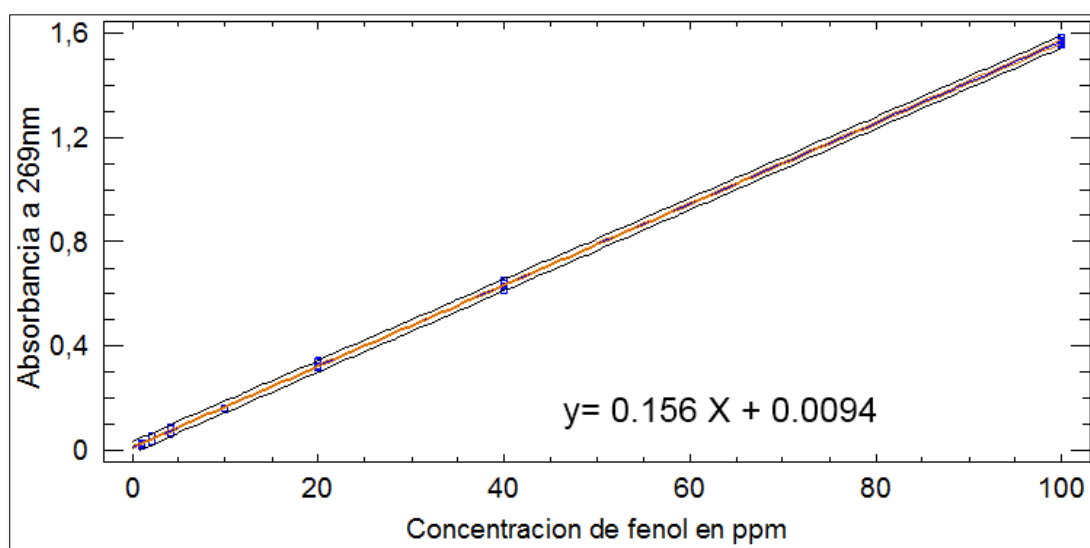
Ecuación de la recta $y = 0,156 X + 0,0094$

$r = 0,999817023$

$R^2 = 0,999634079$

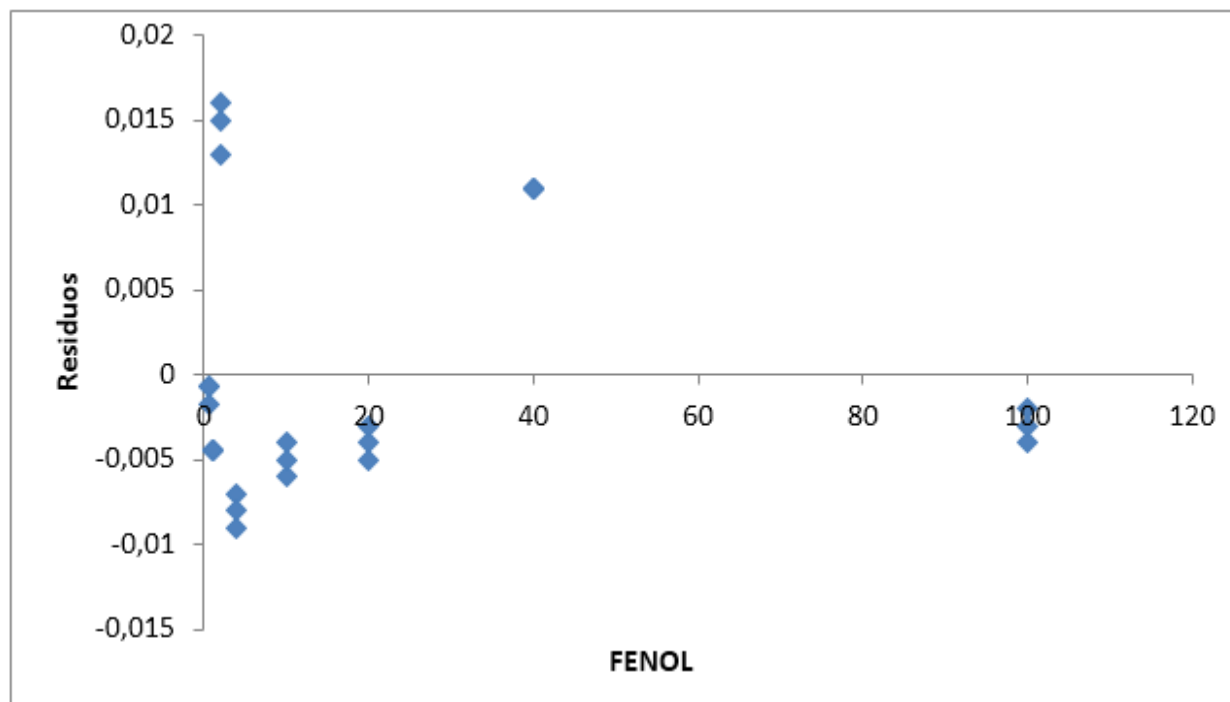
Error = 0,010079831

Figura 11: Curva de calibración para la cuantificación de fenol.



Fuente: El autor

Figura 12: Gráfico de predicciones frente a residuos



Fuente: autor

En la figura 12 se muestra cómo los residuos parecen aleatorios lo cual indica que el modelo de regresión se ajusta bien.

4.5.1. Valor de t calculado para la determinación de correlaciones significativas.

Ho= no existe correlación entre la concentración y la absorbancia.

H= existe correlación entre la concentración y la absorbancia.

T tabulado = 2,01

T calculado = 326,5089646

Como los valores calculados superan los tabulados se rechaza la hipótesis nula y por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa. Por lo tanto se concluye que existe una correlación significativa entre la concentración y la absorbancia.

4.5.2. La desviación estándar de la pendiente y la ordenada.

La desviación estándar de la pendiente se calculó con la ecuación:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (X_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_b = 9,51137E - 05$$

La desviación estándar de la ordenada se calculó con la ecuación:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_a = 0,00195838$$

Con límites de confianza del 95% para:

$$b = 0,01556 \pm 0,00009$$

Y para:

$$a = 0,0094 \pm 0,00395$$

Los valores de S_a y S_b son utilizados para estimar los límites de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen.

Así mismo se calculó los errores aleatorios en los valores de la dirección y , bajo el estadístico:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Donde los valores de \hat{y} son los puntos sobre la recta de regresión calculada a los valores individuales de x .

Difiere de la ecuación de desviación estándar en que las desviaciones $y_i - \bar{y}$ se sustituyen por los residuos $y_i - \hat{y}_i$; su denominador corresponde al número de grados de libertad ($n - 2$).

4.5.3. Límite de detección

(LOD) = $y_B + 3S_B$ donde los valores $y_B = (a)$ y $S_B = (S_{y/x})$ donde $a = 0,0094$ y $S_{y/x} = 0,0100798$ por lo tanto **LOD = 0,03117** Estos datos se interpolan en $y = 0,156x + 0,0094$ determinando que el límite de detección es de 1,94 ppm.

4.5.4. Límite de cuantificación

$$LOQ = y_B + 10 S_B$$

$LOQ = 0,101738$ este dato se interpola en la ecuación de la curva $y = 0,156x + 0,0094$ dando como resultado 6,4614 ppm.

4.5.5. Cálculo de una concentración y su error aleatorio

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

En esta ecuación y_0 es el valor experimental de y , a partir del cual se determina la concentración x_0 .

S_{x_0} es la desviación estándar estimada de x_0 .

b es la pendiente

1 es el número de lecturas, así si se disponen de m lecturas, entonces la fórmula para S_{x_0} se convierte en:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Donde $S_{y/x} = 0,01007983$ y $m = 5$

En la tabla 5 se muestran los cálculos para determinar la concentración y su error aleatorio, en concentraciones que se realizaron a 40ppm, 80ppm y 100ppm cada una por quintuplicado, estas se realizaron con el fin de poder estimar el error asociado a la concentración calculada.

Tabla 5. Límites de confianza al 95% para los cálculos de las concentraciones de fenol y su respectivo error aleatorio.

Yo	Xo	error	Sx0	límites de confianza al 95%
0,62	39,81	0,010079	0,30860628	39,81±0,62
0,62	39,81	0,010079	0,30860628	39,81±0,62
0,62	39,87	0,010079	0,30863291	39,87±0,62
0,62	39,74	0,010079	0,30857978	39,75±0,62
0,62	39,87	0,010079	0,30863291	39,87±0,62
1,25	80,45	0,010079	0,34736992	80,45±0,698
1,25	80,45	0,010079	0,34736992	80,45±0,698
1,25	80,32	0,010079	0,34718637	80,32±0,698
1,25	80,32	0,010079	0,34718637	80,32±0,698
1,25	80,35	0,010079	0,34718637	80,32±0,698
1,53	98,53	0,010079	0,37634641	98,52±0,75
1,53	98,53	0,010079	0,37634641	98,59±0,75

Yo	Xo	error	Sx0	límites de confianza al 95%
1,54	98,59	0,010079	0,37645925	98,59±0,75
1,53	98,59	0,010079	0,37645925	98,59±0,75
1,54	98,59	0,010079	0,37645925	98,59±0,75

4.5.6. Comprobación de los límites de cuantificación y detección. Para comprobar el límite de detección calculado anteriormente se realizaron 10 réplicas a una concentración de 1,94 ppm y se les halló su desviación estándar, la cual fue 0,0448209 ppm.

Para la comprobación del límite de cuantificación al igual que en el paso anterior se realizaron 10 concentraciones a 6,46 ppm y se procedió a realizar su posterior lectura para las cuales su desviación estándar fue de 0,047299 ppm y sus límites de confianza al 95 % fueron de $6,44 \pm 0,1035$ ppm.

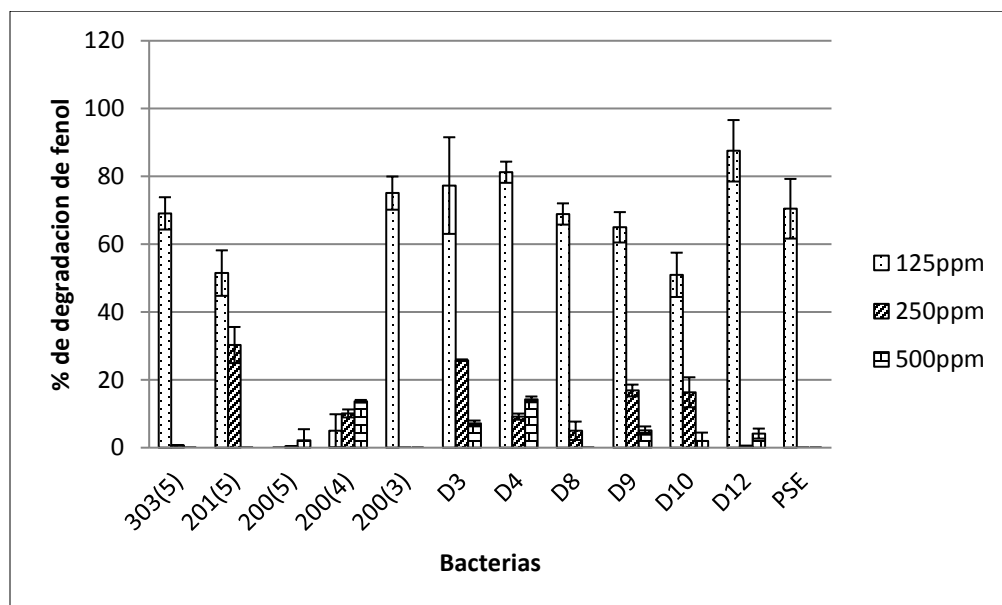
Después de verificar a través de atributos estadísticos que el método analítico es reproducible, selectivo, preciso y lineal, se procedió a realizar la cuantificación del fenol, para así poder asociar que cantidad del contaminante que había sido utilizada para formar nueva biomasa.

4.5.7. Degradación de fenol por parte bacterias en caldo luria. Para el caso en estudio la mayor degradación de fenol en la concentración inicial de 500ppm fue por parte de las bacterias D4 y 200(4) que produjeron un porcentaje de degradación de fenol de 14,2% y 13,7% respectivamente, obteniendo con una diferencia estadísticamente significativa sobre el resto de bacterias (figura13). La degradación en esta concentración fue bastante baja en la mayoría de las bacterias, esto debido al efecto bactericida que tiene el fenol a altas concentraciones.

En la concentración de 250ppm, el mayor porcentaje degradación promedio de fenol fue para las bacterias 201(5) y D3 con un promedio de 30.3% y 25.8 % respectivamente, las demás bacterias no mostraron una diferencia significativa (figura 13 y anexo B).

El mayor porcentaje de degradación del fenol en la concentración de 125ppm fue la por las bacterias D12, D4 Y D3 degradando un promedio de 87,5%, 81,2% y 77,3% respectivamente, sin obtener diferencias estadísticamente significativas entre ellas, pero sí de la bacteria D12 frente al resto de bacterias (figura 13).

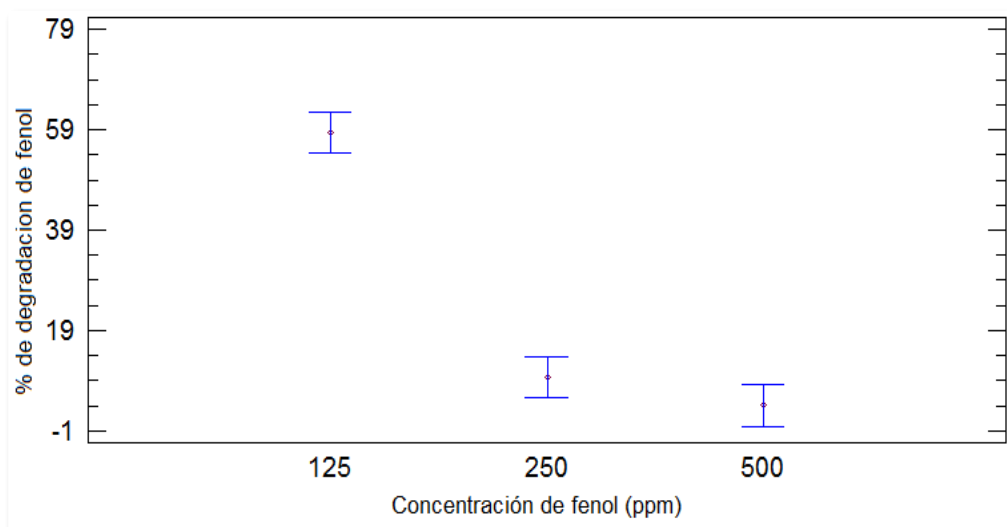
Figura 13: Porcentaje de degradación de fenol por bacterias Caldo Luria.



Fuente: El autor

En la figura 14 se observa cómo a medida que aumenta la concentración de fenol la degradación de fenol disminuye, evidenciándose una relación inversa entre las variables analizadas, encontrándose diferencias significativas solo en la concentración 125ppm. Estudios realizado por Tziotzios, Teliou, Kaltsouni, Lyberatos & Vayenas, 2005 sugieren que concentraciones por encima de 300 mg/L afectan drásticamente la degradación de fenol lo cual concuerda con los resultados de degradación obtenidos, además estos autores reportan que a medida que aumentan las concentraciones de fenol aumentan los periodos necesarios para la degradación de estos.

Figura 14: Medias con Intervalos LDS De 95%, del porcentaje de degradación de Fenol en Luria



Fuente: El autor

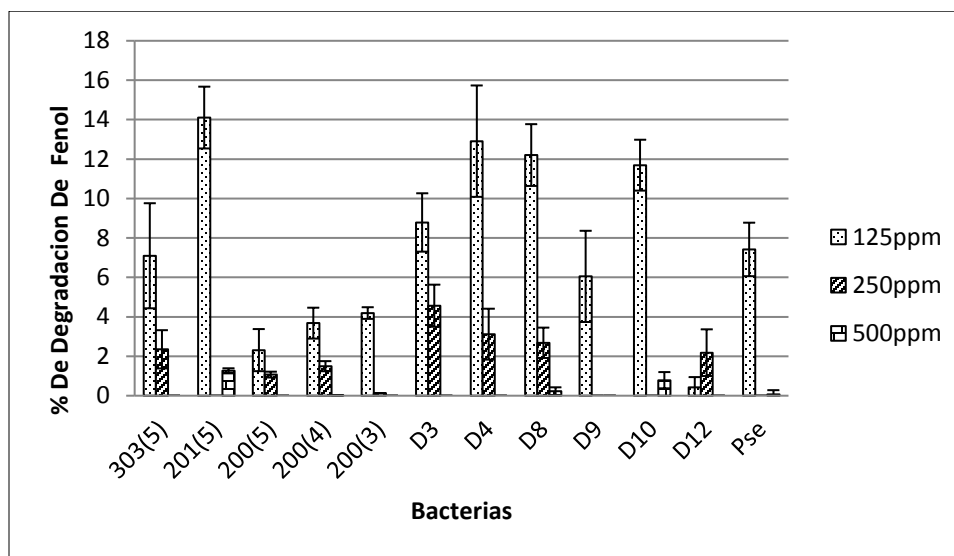
4.6. DEGRADACIÓN DE FENOL EN SALES MINERALES

La mayor degradación de fenol en la concentración de 500ppm fue la obtenida con la bacteria 201(5) obteniéndose un porcentaje de degradación promedio de 1,3 %, se encontró una diferencia significativa para el resto de las bacterias como se puede observar en la figura 15.

En la figura 15 se observa que la mayor degradación lograda en la concentración de 250ppm, fue para la bacteria D3 con un porcentaje de degradación promedio de 4,5%, mostrando una diferencia significativa sobre el resto de bacterias como se puede observar en el anexo B.

Con una diferencia estadísticamente significativa sobre el resto de bacterias (anexo B), las bacterias que más degradaron fenol en la concentración de 125 ppm fueron 201(5), D4, D8 Y D10 con un porcentaje de degradación promedio de 14,1%, 12,9%, 12,2% Y 11,7% respectivamente (Figura 15).

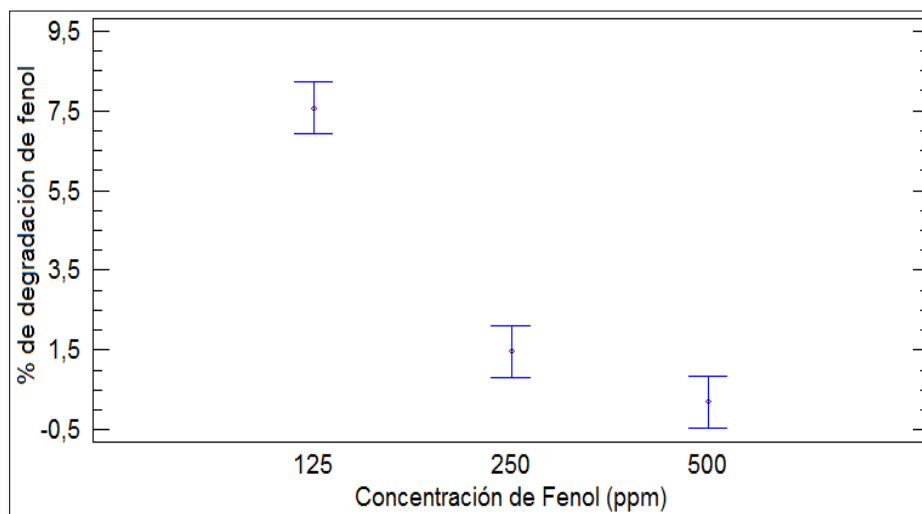
Figura 15: Porcentaje de degradación de fenol (sales minerales).



Fuente: El autor

En cuanto al porcentaje de degradación promedio del fenol de todas las bacterias en las tres concentraciones la ANOVA mostró diferencias significativas entre las tres concentraciones analizadas ($p=0.000$), evidenciando un mayor porcentaje de degradación a concentraciones bajas (125ppm) que a concentraciones altas (500ppm). Las pruebas de rango múltiple, mediante la Diferencia Mínima Significativa de Fischer, indicaron que porcentaje de degradación de fenol en las concentraciones de 250ppm y 500ppm son grupos homogéneos (figura16 y anexo B). A medida que aumentan las concentraciones del xenobiótico aumentan las afectaciones causadas en las bacterias, esto es evidente en el poco fenol que puede ser utilizado por estas. El fenol tiene un comportamiento similar al de los alcoholes y antimicrobianos, afecta a los microorganismos establecidos dentro de la monocapa de la membrana en las cadenas acilo de los fosfolípidos, alterando la fluidez y las conformaciones de las proteínas, dando como resultado una disrupción de la barrera, afectando la transducción de energía, los enlaces de membrana y la actividad enzimática envuelta en esta (Hamme, Singh & Ward, 2003).

Figura 16: Medias Con Los Intervalos LDS De 95%, Que Evidencian el porcentaje de Degradación De Fenol.



Fuente: El autor

4.7. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON POTENCIAL BIOREMEDIADOR

Para la identificación se tomaron las bacterias que lograron un crecimiento y una degradación significativa de fenol a altas concentraciones, sobre el resto de las bacterias. Para las bacterias que fueron cuantificadas en Caldo Luria las bacterias seleccionadas fueron D4 y 200(4) las cuales fueron identificadas como *Sphingomona paucimobilis* y *Bacillus subtilis*.

La bacteria D4 fue identificada por medio de pruebas bioquímicas y fueron corroboradas por medio del método VITEK 2, encontrándose con un 93% de probabilidad de ser *Sphingomona paucimobilis* la cual es una bacteria en forma de bacilo, Gram negativa, aerobia estricta, no fermentadora, oxidasa y catalasa positiva, esta no crece en agar McConkey (Anexo C). En agar sangre en las colonias se observan un pigmento de amarillo “nostoxanthin” (White, Sutton, & Ringelberg 1996), el cual no es una generalidad de todos los aislados, en algunos casos puede aparecer con el tiempo la pigmentación,

su forma es plana e irregular de aspecto acuoso y deslizante (Martínez, María A, & Ovalle, Alfredo 2013).

La bacteria D4 fue sometida a un test de sensibilidad por medio del sistema automatizado VITEK 2 para conocer sobre los antibióticos a los que puede ser sensible este microorganismo. En los resultados se observó susceptibilidad a la ampicilina, cefalotina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepima, Meropenem, Gentamicina y Sulfametazol (tabla 6) los resultados sugieren que las bacterias pueden presentar bajo riesgo de factores de resistencia en esta bacteria aislada.

Inicialmente la bacteria identificada como D4, fue llamada *Pseudomona paucimobilis* por compartir varias características con el género *Pseudomona*, pero con posterioridad fue reclasificada por poseer una membrana con glicoesfingolípidos, componente característico del género *Sphingomonadaceae* (Kawahara y colaboradores en 1991) (Kawahara, 2001).

Algunos miembros del género *Sphingomona* se han caracterizado por su gran habilidad para degradar compuestos que son considerados contaminantes: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Pinyakong, Habe & Omori 2003), dietilftalato y difenil éter, dibenzo-p-dioxinas y dibenzofuranos como única fuente de carbono (Fang, Liang & Zhang, 2007; White, Sutton, & Ringelberg 1996).

Para la especie *Sphingomona paucimobilis* se ha reportado la degradación de: ésteres del ácido ftálico (Chang & colaboradores 2004), 2,3 dimetil naftaleno, antraceno, fenantreno, fluorantreno, hexaclorociclohexano , difenil éter clorinados (Fredrickson 1995), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Ka, Holben & Tiedje, 1994), además de degradar parcialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de alto peso molecular como el: (benzo(a) pireno, benzo(a) antraceno, benzo(a) fluoreno y dibenzin (a,h) antraceno (Story & colaboradores, 2004) hexaclorociclohexano, dibenzo-p-dioxin y dibenzofurano .Además de esto tolera altas concentraciones y es capaz de bioabsorber

compuestos altamente tóxicos para los seres humanos como el cadmio (Tangaromsuk, Pokethitiyook, Kruatrachue & Upatham 2002).

La capacidad catabólica de degradar distintos compuestos xenobióticos por *S. paucimobilis* es amplia, además de esto se conoce de la gran variedad de exopolisacáridos que producen, algunos de los cuales podrían ser utilizados comercialmente para la degradación de distintos compuestos (Fredrickson, Balkwill, Drake, Romine, Ringelberg & White 1995), en bacterias Gram negativas como respuesta al estrés causado por contaminantes se generan polisacáridos que ofrecen resistencia a la transferencia de compuestos lipófilicos (Hamme, Singh & Ward, 2003). Los gluco-esfingolípidos hacen parte de la membrana de las *Sphingomonas*, su estructura es similar a los surfactantes, lo cual le confiere la capacidad de realizar microemulsiones para la absorción de hidrocarburos, función que aún es tema de estudio. (Coppotelli, Ibarrolaza, Dias, Panno, Berthe, & Morelli, 2010).

La distribución de estos microorganismos es bastante amplia encontrándose en suelos, agua, asociado a plantas y como agente infeccioso oportunista en hospitales. En cuanto a las relaciones que puede generar con plantas, se han encontrado asociadas a la rizosfera de plantas. Una característica de gran importancia que se ha encontrado con *S. paucimobilis* es el antagonismo que genera contra un hongo fitopatógeno llamado *Verticillium dahliae* causante de la verticilosis la cual ataca diversos cultivos comerciales entre estos el girasol. Es por esto que es considerada una bacteria de alto interés biotecnológico (White, Sutton, & Ringelberg 1996).

A pesar de esto no todas las reacciones realizadas por las *Sphingomonas* tienen un impacto positivo; en cañerías de cobre, contribuyen a la oxidación, causando un problema significativo en los sistemas de distribución de agua potable que estén elaborados en este material (White, Sutton, & Ringelberg 1996).

La bacteria 200(4) fue identificada como *Bacillus subtilis* pertenece al género de *Bacillus*, reconocido por poseer los microorganismos más utilizados en el control de Fitopatógenos

fúngicos debido a que es capaz de digerir su quitina, además, producen antibióticos como: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina, y circulina (Bernal, Illanes y Ciampi 2002). Entre las características del género *Bacillus* está su forma bacilar, Gram positiva, catalasa positiva son aerobias estrictas o facultativas, saprofitas, quimiorganotrofas, de metabolismo fermentativo y movilidad basilar.

Bacillus subtilis es una bacteria del genero *Bacillus*, aeróbica, algunas crecen a 55°C (Sosa 2011), formadoras de endosporas que le confieren resistencia al calor, comúnmente se encuentra en el suelo aunque está presente en muchos lugares. Las colonias se observan redondeadas o irregulares, de superficie opaca de color crema o café. De las características más destacables es su capacidad de producir proteasa y enzimas en distintos sustratos naturales, controlar enfermedades en diferentes cultivos vegetales (Cruz 2014).

Se ha encontrado que esta bacteria es capaz de producir distintos metabolitos secundarios en forma de lipopéptidos que poseen actividad antifúngica, antibacteriana y frente a algunas levaduras. Esta especie secreta un antibiótico llamado la Bacitracina el cual sólo es producido después de la esporulación (Bernal, Illanes & Ciampi 2002) fengicina (Cruz 2014) micosubtilina, mycobacillin y subtilisina. Según (Janisiewicz., & Korsten, 2002) la aplicación de esta bacteria tiene efectos antagonistas sobre *Collectotrichum gleosporioides*. Debido a esto se considera que esta bacteria tiene un alto valor biotecnológico y farmacéutico (Azevedo, Rios, Fukushima & Campos-Takaki 1993; Stein 2005). Se ha aislado de cultivos de plátano y arroz donde causa la inhibición de crecimiento de fitopatógenos como *Fusarium equiseti* (Castor. 2014), *Fusarium oxysporium*, *Uromyces spp.*, inhibió la actividad de *Botrytis spp* y la germinación de *Puccinia sp.* (Rupa 2011)

Se ha considerado que *B. subtilis* no representa un peligro para los seres humanos pues no es tóxica y tampoco es considerado patógeno, además no afecta a plantas o animales por lo que su utilización en biorremediación no representaría un riesgo.

En ecosistemas contaminados el género *Bacillus* ha presentado resistencia en suelos contaminados con metales como; cobre, cadmio y zinc. *B. subtilis* junto con *B. lincheniformis* se ha visto implicada en la absorción de cobre, cadmio, plomo y (Allievi, 2012). Bacterias como *Bacillus stearothermophilus* han sido reportadas con capacidad de degradar fenol en concentraciones entre 200 y 1000ppm, Sin embargo, ha sido reportado que la bacteria *B. subtilis* solamente podía crecer a una concentración de 9,4 ppm de fenol.

Tabla 6. Información de sensibilidad presentada para *S. paucimobilis*.

Antibiótico	CMI mg/L	Interpretación
Ampicilina	<=2	S*
Cefalotina	<=2	S*
Cefuroxima	<=1	S*
Ceftazidima	<=1	S*
Cefriaxona	<=1	S*
Cefepima	<=1	S*
Meropenem	<=0,25	S*
Gentamicina	<=1	S*
Sulfametazol	<=20	S*

*S= sensible

Al comparar la degradación de las bacterias *S. paucimobilis* (D4), *Bacillus subtilis*(2004) y 201(5) con reportes, la degradación bacteriana de fenol presentada por estas tres bacterias es baja, además las concentraciones de fenol que estas bacterias soportan pueden ser aún más altas, sin embargo las bacterias de este estudio no han sido sometidas a ningún tipo de “adaptación”.

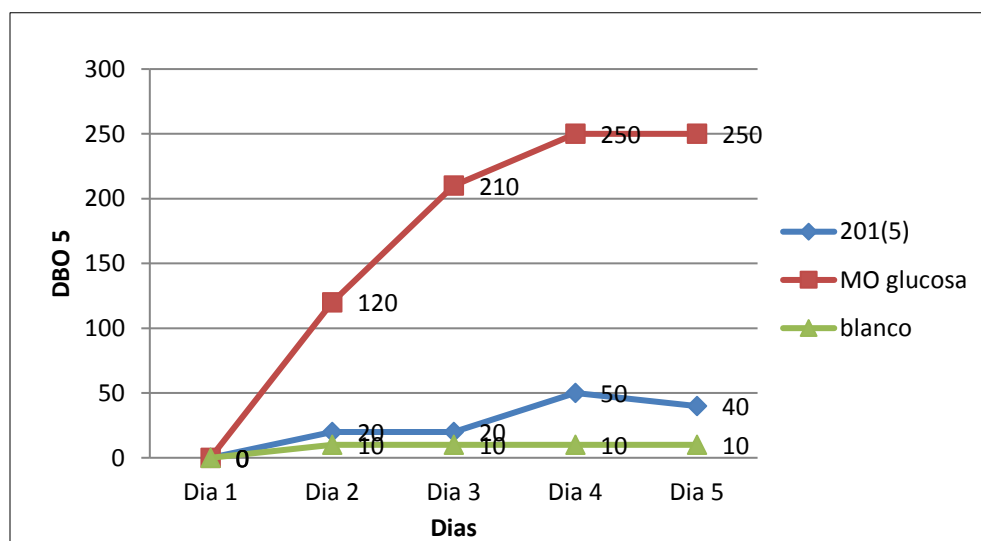
4.8. EVALUACIÓN RESPIROMETRICA DE LA DEGRADACIÓN DE FENOL

Para las pruebas respirométricas se procedió a trabajar con las tres bacterias seleccionadas, sin embargo las bacterias *S. paucimobilis* (D4), *Bacillus subtilis* (200(4))

no mostraron un crecimiento significativo puesto que estas se seleccionaron de los medios que contenían caldo luria, lo cual suministraba una fuente de carbono adicional para los microorganismos y cuando se colocaron en el medio que solo contenía solución salina su degradación disminuyó abruptamente (resultados no mostrados). Es por esta razón que se decidió realizar las pruebas respirométricas con la bacteria 201(5), por ser la que presentó mayor degradación del fenol en la concentración más alta.

En la figura 17 se puede observar como el fenol afecta negativamente la población microbiana, puesto que la cantidad de oxígeno que consume el microorganismo 201(5) es significativamente menor cuando se expone al fenol, que cuando se expone el microorganismo a una fuente de carbono (glucosa) fácilmente asimilable y en cantidades iguales.

Figura 17: Demanda biológica de oxígeno.



Fuente: El autor

Sin embargo se puede observar, al comparar las muestras con el blanco, que se presentó un aumento en el consumo de oxígeno cuando se expone a la bacteria 201(5) al fenol en el día 2, hay un aumento en el consumo de oxígeno 20 mg/L el cual se mantiene hasta el día 3, en el día 4 ocurre un aumento en el consumo promedio de oxígeno el cual fue de 50 mg/L, relacionado con la capacidad de convertir (oxidar) el fenol

en CO₂ y H₂O, pero a partir del día 4 comienza a haber un descenso en la cantidad de oxígeno consumido por las bacterias, probablemente causado por que los productos de degradación de estas afectan el crecimiento o la capacidad de seguir degradando el fenol. La disminución en el consumo de oxígeno cuando se expone el microorganismo al fenol no se asocia a una disminución en la cantidad de la fuente de carbono, puesto que el consumo de oxígeno se muestra constante a partir del día 4 cuando el microorganismo tiene como fuente de carbono la glucosa.

Se compararon los resultados obtenidos por las muestras de la bacteria 201(5), tomándose como base el fenol remanente, en las mediciones se obtuvo la degradación promedio de 15.64 ppm (3,5% de fenol degradado) para comparar los resultados obtenidos con la respirometría, se tomaron como base 40 mg/L de oxígeno consumidos y se obtuvo una degradación de 8,5 mg de fenol, los cuales equivaldrían al fenol que fue totalmente mineralizado.

En un rango de concentraciones similares y en un tiempo de 24 horas se ha logrado la completa degradación del fenol por bacterias de distintas especies, (Kanekar, Sarnaik & Kelkar, 1998; Dey y Mukherjee en el 2010) sin embargo como se dijo anteriormente las bacterias sometidas en este trabajo no han sido adaptadas ni a las condiciones de laboratorio ni a diferentes concentraciones de fenol, con lo cual sólo se evaluó su capacidad intrínseca para degradar fenol, las cuales podrían mostrar mejores respuestas en crecimiento y degradación, si fueran expuestas gradualmente a diferentes concentraciones de fenol.

4.9. ANÁLISIS DE LOS GRUPOS FUNCIONALES POR MEDIO DE FTIR

Los FTIR obtenidos después de exponer las bacterias D4 y 200(4) al Fenol a una concentración de 500ppm durante un periodo de 48h se compararon con los espectros obtenidos para el fenol y se resumen en la tabla 7. En el anexo 1 se muestra el espectro obtenido para el fenol se puede observar un estiramiento del enlace O-H que aparece alrededor de los 3590 cm⁻¹, donde se muestra en el espectro una banda que permite

inferir una absorción poco intensa y reducida que va desde los 3650 hasta 3550 cm^{-1} esta no se ve como una banda típica del fenol puesto que su concentración para el FTIR es baja, además aparece una absorción tipo estiramiento entre los 1260 y los 1000 cm^{-1} .

En el anexo 1 se observa en la gráfica una disminución de la banda del $-\text{OH}^-$ del fenol en los 3550 y 3650 cm^{-1} cuando el fenol es expuesto a las bacterias D4 y 200(4), sin embargo la reducción de esta banda es drástica para la bacteria D4. Así mismo se puede observar el estiramiento de la banda a los 1200 cm^{-1} lo cual es característico del grupo C-O, este aparece para el fenol intenso, tenue para la bacteria 200(4) y no aparece para la bacteria D4. A pesar de esto no se puede afirmar que el aromático fue escindido puesto que las señales típicas de este aparecen, entre los 3000 – 3070 cm^{-1} y 1500- 1600 cm^{-1} .

Tabla 7. Asignación de bandas más importantes en el fenol.

Grupo	Intervalo de frecuencia (cm^{-1})	D4 (cm^{-1})	200(4) (cm^{-1})	Fenol (cm^{-1})
O-H	3600 - 3200	/	3590	3590
C-O	1260 y 1000	1187,7-1184,0- 1088,8-1044,7- 1024,8	1187,7-1184,0- 1088,8-1044,7- 1024,8	1187,7-1184,0- 1088,8-1044,7- 1024,8

4.10. PROPUESTA DE DEGRADACIÓN DEL FENOL PARA LAS BACTERIAS

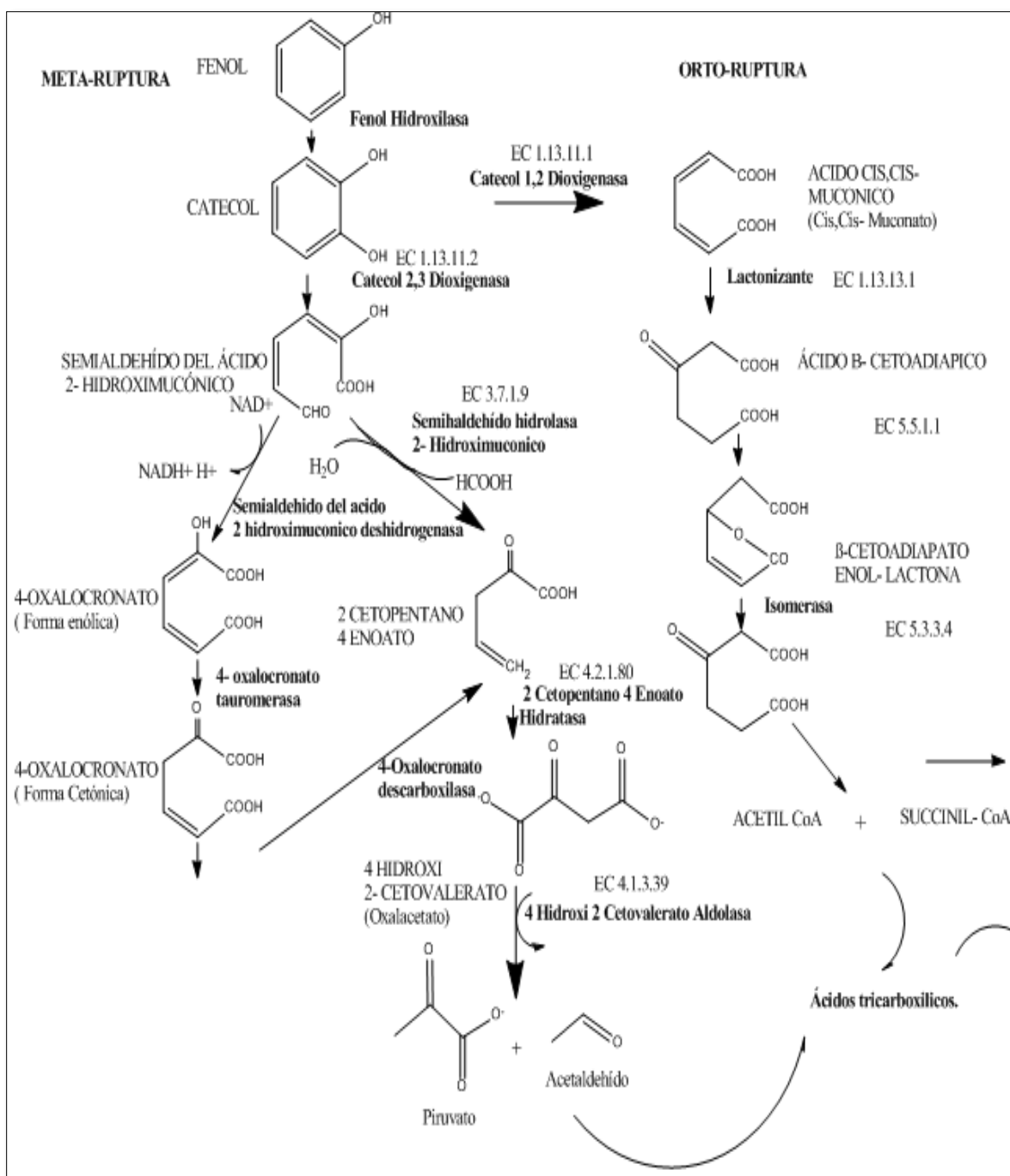
Para la realización de esta propuesta de degradación se revisó por medio de la bibliografía las diferentes vías y enzimas que intervenían para transformar fenol, posterior a esto se contrastó la información literaria de las enzimas que poseen los microorganismos identificados en este trabajo. Encontrándose que la degradación del fenol por parte de los microorganismos generalmente incluye la oxidación del anillo aromático que da como resultado el catecol (Figura 18), a partir de esta forma puede darse la apertura del anillo aromático por las formas orto o meta ruptura:

En la meta oxidación la primera enzima en romper el anillo aromático es la catecol 1,2 dioxigenasa, la cual se encarga de romper entre uno de los átomos de carbono portador del grupo hidroxilo y el carbono adyacente transformando de catecol a ácidos cis-cis muconico y dando como último resultado acetilacetaldehído y piruvato este es el precursor de mayor importancia en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Shingler, Franklin, Tsuda, Holroyd, & Bagdasarian, 1989; Farràs & Giménez, 1997).

La orto ruptura se da en los carbonos que tiene el grupo OH (intradiol) en la posición 1-2 en el catecol el cual es transformado a ácido cis, cis, Muconico, posteriormente se produce su lactonización a ácido B-cetoadiapico (muconato), que es isomerizada en otro compuesto, dispuestos de forma distinta como el B-Cetoadiapico enol-lactona (B-cetoadiapato enol-lactona). Como último resultado de la degradación por esta vía se genera el succinato y el acetil coA el cual pasara a ser parte posteriormente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Katayama, Tobita, & Hirayama, 1991; Farràs & Giménez, 1997).

Tanto la meta ruptura como la orto ruptura se encuentran esquematizada en la figura 18, la degradación de compuestos aromáticos de manera aeróbica en el género *Sphingomonas* se observó que es mediada por la acción de la enzima 2,3 dioxigenasa (Suenaga, Koyama, Miyakosh, Miyazaki, Yano, Sota, & Miyazaki, 2009), lo cual nos indicaría que la posible vía de degradación *S. paucimobilis* sea por la metaruptura. Al fenol expuesto a la bacteria *S. paucimobilis* se les realizaron los respectivos espectros FTIR sin embargo estos resultados no mostraron diferencias, esto pudo ser en gran medida por la poca degradación de esta bacteria a esta concentración tan alta de fenol en la cual fue evaluada.

Figura 18: Ruta de degradación del fenol.



Fuente: Tomado de Shingler, Franklin, Tsuda, Holroyd, & Bagdasarian, 1989; Farràs & Giménez, 1997; José A. García 200), adaptada por El autor.

5. CONCLUSIONES

Del consorcio bacteriano asilado de suelos arroceros del Tolima, constituido por 26 microorganismos, *Sphingomona paucimobilis* y *Bacillus subtilis* evidenciaron la mayor capacidad para degradar el fenol sin ningún tipo de adaptación, bajo las condiciones del ensayo. La biorremediación de suelos arroceros con estas bacterias podría constituirse en una alternativa para la recuperación de suelos contaminados con xenobióticos de tipo fenólico.

El trabajo aisló e identificó hasta el nivel de especie dos bacterias entre las 26 encontradas en suelos arroceros del Tolima.

Con el apoyo de la literatura se propuso un posible mecanismo de degradación del xenobiótico bajo estudio, lo cual resulta innovador en trabajos de este tipo realizados en nuestro grupo de investigación (GIPRONUT) y en la UT.

El trabajo permitió implementar y ajustar un método de bioremediación aplicable a laboratorios de moderada disponibilidad de equipos.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Verificar la capacidad de degradación de xenobióticos de las bacterias aisladas e identificadas, pero utilizando fenoles de estructura química más compleja y/o funcionalidad química diferente a la del fenol, por ejemplo el 4,6-dinitro-orto cresol.

Repetir el ensayo en suelos cultivados con otro tipo de planta de interés comercial en el Tolima, por ejemplo algodón.

Implementar la metodología aplicada en el trabajo a nivel de invernadero, a fin de hacer un mayor acercamiento a las condiciones de campo.

Utilizar la técnica de HPLC para evidenciar los cambios estructurales que sufre el fenol durante el tiempo de interacción con las bacterias.

Así mismo, podrían llevarse a cabo trabajos dirigidos hacia el análisis secuencial de metagenomas que muestren funciones biológicas específicas y sus etapas evolutivas a través de una amplia gama de cepas bacterianas; todo lo cual sería de gran utilidad en la búsqueda de nuevos hallazgos en el tema de biorremediación.

Se recomienda la adaptación progresiva de los microorganismos al fenol y a las condiciones del laboratorio, con lo cual se espera mayor degradación del fenol.

LOGROS

Aislamiento 26 microorganismos, dos de los cuales están identificados y entregados al cepario de la universidad del Tolima.

Con la ayuda de la revisión literaria se logró construir una propuesta de degradación del fenol por parte de las bacterias que tiene en cuenta los productos formados y enzimas que intervienen en cada paso del proceso.

La formación y capacitación de un joven investigador en temas de biorremediación.

REFERENCIAS

Ahumada Arias, M. P., & Gómez Ibarra, R. K. (2009). Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría.

Allievi, M. C. (2012). S-layer de *Bacillus sphaericus*: caracterización, regulación, análisis funcional y aplicaciones (Doctoral dissertation, Thesis. University of Buenos Aires. Available: http://bldigital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5143_Allievi.pdf Accessed 28 June).

Amarala S., Sepúlveda M., Catetoc Carolina A..., Fernandesc Isabel P., Rodrigues Alírio E., Belgaceme M Naceur, Barreiroc M. Filomena, (2011) . Fungal degradation of lignin-based rigid polyurethane foams.

Ania, O., & Concepción, M. (2011). Depuración de Efluentes Industriales con Carbón Activo. Adsorción de contaminantes y regeneración del adsorbente

Argüello, A. L. (2001). Biodegradación De Fenol Empleando Microorganismos Inmovilizados. *Universidad Del Zulia*. República Bolivariana De Venezuela.

Arroyave F. Milena Silva, Correa Restrepo Javier (2009). Análisis De La Contaminación Del Suelo: Revisión De La Normativa Y Posibilidades De Regulación Económica.

Avramova, T., Sotirova, A., Galabova, D., & Karpenko, E. (2008). Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 415-420.

Azevedo, E. C., Rios, E. M., Fukushima, K., & Campos-Takaki, G. M. (1993). Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 42(1), 1-7.

Baek, S. O., Field, R. A., Goldstone, M. E., Kirk, P. W., Lester, J. N., & Perry, R. (1991). A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water, air, and soil pollution*, 60, 279-300.

Bollag, J. M., Mertz, T., & Otjen, L. (1994). Role of microorganisms in soil bioremediation. In (pp. 2-10). ACS Publications.

Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C., & Arrighi, L. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of hazardous materials*, 160(2), 265-288.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.

Caballero B, S. A. (2000). Degradación fotocatalítica de fenol mediante TiO₂ modificado con metales de transición y sulfato. Tesis doctoral. Universidad de Malaga, España.
Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). Biología. Ed. Médica Panamericana.

Cantini L. R., L Diaz B., S. Davila y L. Soto Q.(2001) *Crecimiento a diferentes concentraciones de fosforo y nitrógeno de un cultivo puro de bacterias degradadoras de fenantreno.Ciencia.*

Carrillo-Pérez, E., E.Ruiz-Manriquez, A., & Yeomans-Reina, H. (2011). Aislamiento, identificación y evaluación de un cultivo mixto de microorganismos con capacidad para degradar DDT. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 20, 69-75.

Castor, L. R. O. 2014.Capacidad antagónica y quitinolítica de microorganismos aislados de residuos de higuera (Ricinus communis) .Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol 12 No. 1 (5 6-61) .

Cerón Rincón, L.E. & Melgarejo, L.M. (2005). Enzimas de suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana*.10:5-17.

Cerón Rincón, Laura Emilia, & Ramírez Valencia, Eduardo. (2011). Actividad microbiana en suelos y sedimentos en el sistema córdoba juan amarillo, Bogotá D.C. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(136), 349-361. Retrieved November 14, 2016, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-39082011000300008&lng=en&tlng=es.

Cerón Rincón, Laura Emilia. (2013). Indicadores de salud y calidad de suelos en cuencas hídricas en Bogotá. *Colección Gestión ambiental*. Universidad EAN, Pag 7-11. Disponible en <http://repository.ean.edu.co/bitstream/handle/10882/3984/Indicadores%20Salud.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.

Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Patel, T. N., & Tiwari, K. K. (2010). Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater. *Journal of Environmental Biology*, 31(3), 293.

Chong, N. M. & Huang, J. C. (2012). Production of xenobiotic degrader for potential application in bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 125, 305-311.

Coppotelli, B. M., Ibarrolaza, A., Dias, R. L., Del Panno, M. T., Berthe-Corti, L., & Morelli, I. S. (2010). Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA. *Microbial ecology*, 59(2), 266-276.

Cruz A. A. (2014). Caracterización de bacterias antagonistas en el control de hongos fitopatógenos in vitro. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro. Departamento De Microbiología. México.

Cruz, A. B., Barra, J. E., del Castillo, R. F., & Gutiérrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Revista Ecosistemas*, 13(2).

Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU. (1995). Resumen de salud pública hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

Díaz de Armas, M. Hernández Oramas, I., Martínez de Santelices Cuervo, M., Licea Tornés, M., Gómez Bañobre, L., Louro González, G., Morera Fernández, Y. & González.

Dibble, J. T., & Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 729-739.

Hernández, E. (1998). Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad. *Revista Cubana Farm*, 32.(2), 106–112.

Dick A. & Tabatabai, M.A. 1992. Significance and Potential Use of Soil Enzymes. En: Meeting, FJB (Ed.). *Soil Microbial Ecology: Applications in Agriculture and Environmental Management*. Marcel Deckker, NY, USA. pp. 95-127.

Davì, M. L., & Gnudi, F. (1999). Phenolic compounds in surface water. *Water Research*, 33(14), 3213-3219.

Environmental Protection Agency (1984a) Methods 604. Phenols in Federal Register. October 26, Part VIII, 40 cfr, Part 136, 58 pp.

Essam, T., Amin, M. A., Tayeb, O. E., Mattiasson, B., & Guieysse, B. (2010). Kinetics and metabolic versatility of highly tolerant phenol degrading *Alcaligenes* strain TW1. *Journal of hazardous materials*, 173(1), 783-788.

Estrella, c. T. Et al., resolución de una mezcla terciaria de clorofenoles mediante calibración multivariante del tipo pls-1 y detección por espectroscopía uv-vis.

Fang, H. H. P., Liang, D. W., Zhang, T., & Liu, Y. (2006). Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. *Water Research*, 40(3), 427-434.

FAO, IFA. (2002). Fertilizantes y su uso. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-x4781s.pdf>

Farràs, R. P., & Giménez, A. J. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté.

Flock Colin (1998). Bioremediation of phenols and chlorophenols with soybean peroxidase (SBP) and crude soybean seed hulls: modeling and experimental studies . *The University of Western Ontario*. Faculty of Graduate studies. Pag 1-12.

Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Romine, M. F., Ringelberg, D. B., & White, D. C. (1995). Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Applied and environmental microbiology*, 61(5), 1917-1922.

Futamata, H., Harayama, S., & Watanabe, K. (2001). Diversity in kinetics of trichloroethylene-degrading activities exhibited by phenol-degrading bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(2), 248-253.

Garcias Melo J.A. (2007). Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. Tesis Doctoral. Universidad autónoma del estado de Hidalgo. México.

Guerin, T. F. (1999). Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ land treatment. *Journal of hazardous materials*, 65(3), 305-315.

Guerrero-Zuñiga, L. A. & Rodríguez-Dorantes, A. M. (2009). Efecto de la presencia de fenantreno sobre la expresión proteínas y la actividad enzimática radical de *Cyperus hermaphroditus*. *Polibotanica*, 103-130.

Haritash, A. K. & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169.

Haslam, E. (1998). Practical Polyphenolics. From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Ho, K. L., Lin, B., Chen, Y. Y., & Lee, D. J. (2009). Biodegradation of phenol using *Corynebacterium* sp. DJ1 aerobic granules. *Bioresource technology*, 100(21), 5051-5055.

Heipieper, H. J., Keweloh, H., & Rehm, H. J. (1991). Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1213-1217.

He-Ping Zhao, Lei Wang, Jiao-Rong Ren, Zhuo Li, Min Li y Hong-Wen Ga (2008). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5. *Journal of Hazardous Materials*. Num 152, Pag 1293-1300.

Hopper D J and DG Taylor (1975). Pathways for the Degradation of m-Cresol and p-Cresol by *Pseudomonas putida*. *Bacteriol* Pag 122(1):1-6.

Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 411-441.

Jiménez, M. A. P. (1996). Caracterización molecular de la ruta catabólica del 4-hidroxifenilacetato de" *Escherichia coli* W (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. Tesis. Pag 10-17.

Jusoh, N., & Razali, F. (2012). Microbial consortia from residential wastewater for bioremediation of phenol in a chemostat. *Jurnal Teknologi*, 48(1), 51-60.

Kanekar, P. P., Sarnaik, S. S., & Kelkar, A. S. (1998). Bioremediation of phenol by alkaliphilic bacteria isolated from alkaline lake of Lonar, India. *Journal of applied microbiology*, 85(S1), 128S-133S.

Kanaji Masakorala, Jun Yao, Minmin Cai, Radhika Chandankere, Haiyan Yuan, Huilun Chen (2013). Isolation and characterization of a novel phenantrene (PHE) degrading strain *Psuedomonas sp.* USTB-RU from petroleum contaminated soil. *Journal of hazardous materials*. Artículo en impresion 2013.

Katayama-Hirayama, K. E. I. K. O., Tobita, S., & Hirayama, K. (1991). Metabolic pathway of phenol in *Rhodotorula rubra*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 37(4), 379-388.

Knackmuss, H. J. (1996). Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *Journal of Biotechnology*, 51, 287-295.

Krishna, V. M., Hrushikesh, N., Sreehari, K., Kumar, T. A., Vidyavathi, N., & Pallavi, A. (2011). Studies on bioremediation of Phenol by earthworm. *International Journal of Environmental Sciences*, 1, 1268-1273.

Lacorte S. and Barcelo D. (1994) Rapid degradation of fenitrothion in estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1159-1163.

Lapiente Arago, R. (2000). Estudio voltametrico y espectroscopico de los polimeros creados por oxidación electroquímica de fenol sobre electrodos metálicos.

Largo Castro, D. P., & Villamarín Coral, K. M. (2013). Caracterización y activación química de arcilla tipo bentonita para su evaluación en la efectividad de remoción de fenoles presentes en aguas residuales.

Lee, D. J., Ho, K. L., & Chen, Y. Y. (2011). Degradation of cresols by phenol-acclimated aerobic granules. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(1), 209-215.

Lepik & Tenno T. (2011). Biodegradability of phenol, resorcinol and 5-methylresorcinol as single and mixed substrates by activated sludge.

López Antonio Biorremediación y fitorremediación en suelos contaminados. *Universidad Complutense*. Pág. 70-86.

Martínez D. (2010). Elucidación de la ruta de degradación de fenantreno por la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA: incursión en estrategias metabólicas y proteómicas. *Universidad nacional de Quilmes*.

Masakorala, K., Yao, J., Cai, M., Chandankere, R., Yuan, H., & Chen, H. (2013). Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Pseudomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 263, Part 2, 493-500.

Melo P., M. Bracho, Laugeny Diaz & I. Araujo 2009. Productos metabólicos de la degradación de fenantreno por *Bacillus* sp. *Universidad Del Zulia, Maracaibo, Venezuela*.

Mohan Krishna.V, Hrushikesh.N, Sreehari.K, AravindKumar.T, Vidyavathi.N, Pallavi. A. (2011). Studies On Bioremediation Of Phenol By Eartworm. *International Journal Of Environmental Science*. Volume 1, No 6, Pag 1268-1272.

Monroy Fonseca, M. A. (2010). Carbones activados con actividad biológica: aplicación en la degradación de compuestos fenólicos procedentes de aguas residuales de la industria metalúrgica de Nobsa–Boyacá. (Universidad Nacional de Colombia).

Muñoz Santibañez, A. E. (2011). Proceso Fenton y foto-Fenton para la remoción de fenoles de efluentes generados en una planta de celulosa kraft. Universidad de Federal de Vicos.

Napoles J. y Abalos A. 2007 Bioremediación De Ecosistemas Contaminados Con Xenobióticos. Universidad De Oriente

Nyuk-Min Chong y Jung-Cheng Huang (2012). Production of xenobiotic degrader for potential application in bioaugmentation. *Bioresource Technology*. Vol. 125, Pag. 305–311.

O. Ania,, & Concepción, M. (2011). Depuración de Efluentes Industriales con Carbón Activo. Adsorción de contaminantes y regeneración del adsorbente.

Olivier Potin ,Catalina Rafin Etienne Veignie .Biorremediación De Una Edad Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)-Suelo Contaminado Por Hongos Filamentosos Aislados Del Suelo.

Ortiz Lopez A. (2004) Degradación de hidrocarburos en suelos: Efecto de adición de cosubstratos gaseosos.

Ortiz L. M. & Daniel Uribe Vélez (2010). Determinación de la actividad lignocelulolítica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabana de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical.

Orupõld, K., Maširin, A., & Tenno, T. (2001). Estimation of biodegradation parameters of phenolic compounds on activated sludge by respirometry. *Chemosphere*, 44(5), 1273-1280.

Paraskevi N & G Stephannou (2005). Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*

Patel, V., Cheturvedula, S., & Madamwar, D. (2012). Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials* Pag, 43-51.

Pedetta, A., Pouyte, K., Herrera Seitz, M. a. K., Babay, P. A., Espinosa, M., Costagliola, M. et al. (2013). Phenanthrene degradation and strategies to improve its bioavailability to microorganisms isolated from brackish sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 161-167.

Pérez Córdo M (2008) Estudio y desarrollo de técnicas respirométricas para el control de la estabilidad del compost.

Pei, X. H., Zhan, X. H., Wang, S. M., Lin, Y. S., & Zhou, L. X. (2010). Effects of a Biosurfactant and a Synthetic Surfactant on Phenanthrene Degradation by a *Sphingomonas* Strain. *Pedosphere*, 20, 771-779.

Peressutti, S. R. (2000). *Dinámica de las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos en un ecosistema de suelo patagónico* (Doctoral dissertation, Ph. D. Tesis, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Argentina.

Perucci, P., Casucci, C. & Dumontet, S. 2000. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32:387-399.

Polymenakou, P. N. & Stephanou, E. G. (2005). Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil Pseudomonad. *Biodegradation*, 16, 403-413.

Rangel-García, M. D. L., Rodríguez-Martínez, J., Garza-García, Y., & Martínez-Hernández, J. L. (2010). Optimización de iones de fierro para la eliminación de piocianina en la reacción de degradación de Tolueno, Benceno y Fenol por *Pseudomonas aeruginosa*. *Agrociencia*, 44(2), 235-247.

Rappoport, Z. (2004). *The Chemistry of Phenols*, 1 Volume Set. John Wiley & Sons. Pag 6-12.

Raymon Chang (2007) *Química*. Novena edición. Mc Graw Hill. Pag 1117.

Reza Soudi Mohammad y Kolahchi Narjes (2011). Bioremediation potential of a phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1 *Progress in Biological Sciences* Vol. 1, No.1, Pag31-40

Rodríguez González, C. (2012). *Obtención de hojas de óxido de grafeno para el desarrollo de nanocompositos poliméricos* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma De Nuevo León).

Rodríguez, M. (2003). Fenton and UV-vis based advanced oxidation processes in wastewater treatment: Degradation, mineralization and biodegradability enhancement. Universitat de Barcelona.

Rojas Sierra, J., & Moreno Sarmiento, N. (2008). Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 50-62.

Romeu, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., & Eslava, C. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista CENIC*, 4, 39.

Rupa, L. (2011). Screening and Potency Evaluation of Antifungal from Soil Isolates of *Bacillus subtilis* on Selected Fungi. Screening and Potency Evaluation of Antifungal from Soil Isolates of *Bacillus subtilis* on Selected Fungi, 10(07), 35-37.

Samanta, S. K., Singh, O. V., & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20, 243-248.

Saravanan P, Pakshirajan K . Saha P (2008). Kinetics of phenol and m-cresol biodegradation by an indigenous mixed microbial culture isolated from a sewage treatment plant.

Singleton, I. (1994). Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 59, 9-23.

Shingler, V., Franklin, F. C. H., Tsuda, M., Holroyd, D., & Bagdasarian, M. (1989). Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *Journal of general microbiology*, 135(5), 1083-1092.

Sosa López, A. I., Pazos Álvarez-Rivera, V., Torres Campos, D., & Casadesús Romero, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(1), 39-44.

Somnath, M., Subhankar, C., & Tapan, K. D. (2007). A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-

hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2, 3-dioxo-5-(29-hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid. *Microbiology*, 153, 2104-2115.

Sosa López, A. I., Pazos Álvarez-Rivera, V., Torres Campos, D., & Casadesús Romero, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(1), 39-44.

Soudi, M. R. & Kolahchi, N. (2012). Bioremediation potential of a phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1. *Progress in Biological Sciences*, 1, 31-70.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.

Sýkora, J., Pado, M., Tatarko, M., & Izakovič, M. (1997). Homogeneous photo-oxidation of phenols: influence of metals. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 110(2), 167-175.

Sudip K. Samanta, Om V. Singh and Rakesh K. Jain (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in biotechnology*. Vol 20 No.6, Pag 243-246.

Sudipta, D., & Somnath, M. (2010). Performance and kinetic evaluation of phenol biodegradation by mixed microbial culture in a batch reactor. *International Journal of Water Resources and Environmental Engineering*, 3(2), 40-49.

Suenaga, H., Koyama, Y., Miyakoshi, M., Miyazaki, R., Yano, H., Sota, M., ... & Miyazaki, K. (2009). Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis. *The ISME journal*, 3(12), 1335-1348.

Sutherland, J. B., Freeman, J. P., Selby, A. L., Fu, P. P., Miller, D. W., & Cerniglia, C. E. (1990). Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*. *Archives of microbiology*, 154, 260-266.

Tambekar, D. H., Bhorse, P. S., & Gadakh, P. V. (2012). Biodegradation of phenol by native microorganisms Isolated from Lonar Lake in Maharashtra state (India). *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 2(4), 26-30.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). Introducción a la Microbiología. Ed. Médica Panamericana.

U.S. Department Of Health And Human Services (1998). Toxicological Profile For Phenol. Agency for Toxic Substances & Disease Registry.

Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549. doi:10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003

Vargas, M. E. S., & Eugenia, M. (2003). Preconcentración selectiva de fenoles contaminantes prioritarios y determinación por espectrofotometría ultravioleta-visible, cromatografía líquida de alta eficacia y cromatografía de gases-espectrometría de masas. *Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones*.

Veeresh, G. S., Kumar, P., & Mehrotra, I. (2005). Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research*, 39(1), 154-170.

Vilas Patel, SravanthiCheturvedula, DattaMadamwar (2012) Phenanthrene degradation by pseudoxanthomonas sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials*. Num 201-201, Pag 43-51.

Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1163-1172.

VITEK, Biomerieux.es, tomado de:
http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?doc=SPN_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_7#

Vivero Escoto, J. L. (2008). *Eliminación de fenol y sus derivados por ozonización como etapa previa a la biodegradación* (Doctoral dissertation).

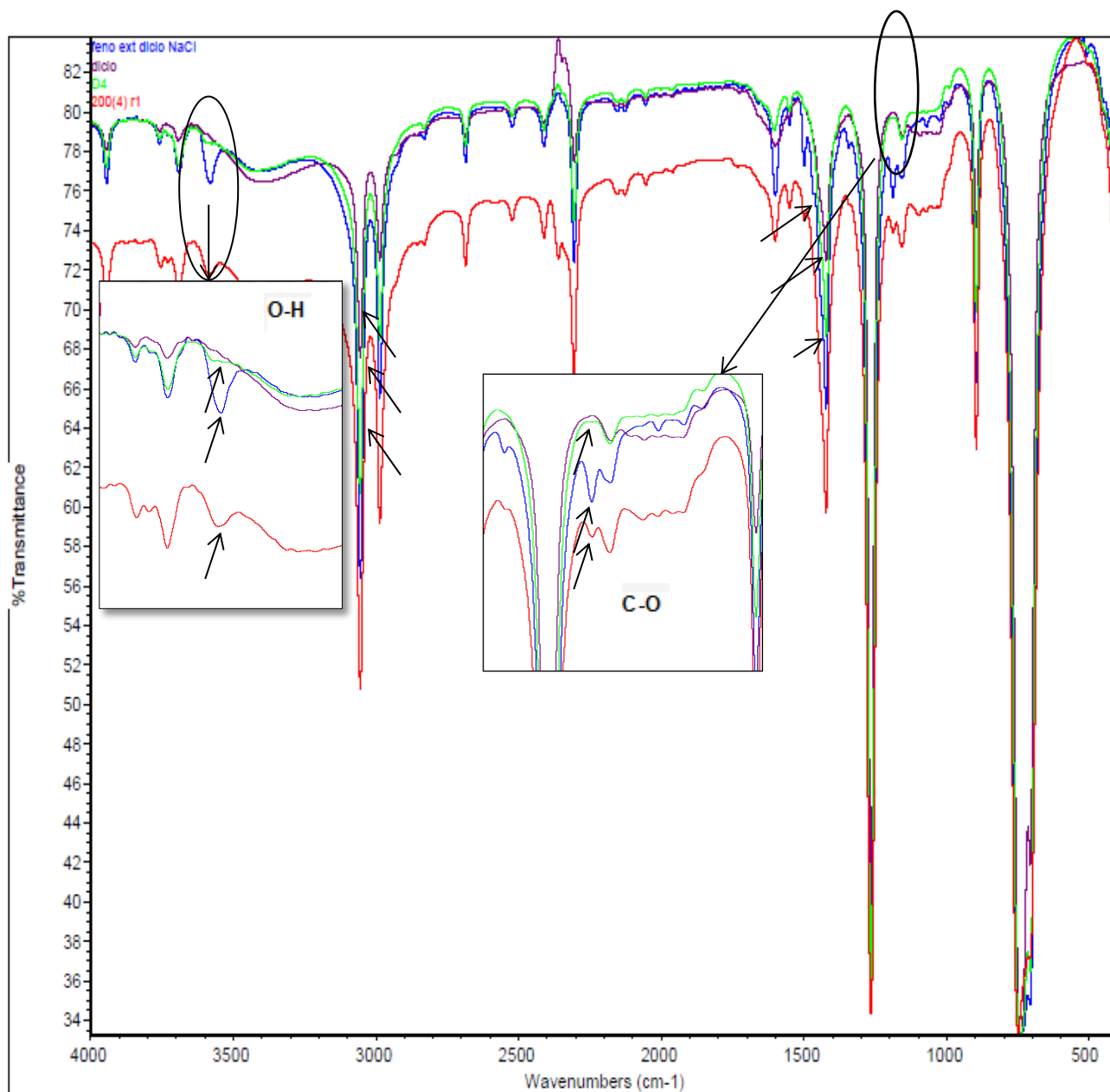
Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 237-241.

Wilson, S. C. & Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution*, 81, 229-249.

Zhao, H. P., Wang, L., Ren, J. R., Li, Z., Li, M., & Gao, H. W. (2008). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5. *Journal of Hazardous Materials*, 152, 1293-1300.

ANEXOS

Anexo A: ESPECTROS DE IR DE FENOL (Azul), SOLVENTE (morado) Y BACTERIAS 204(rojo) Y D4 (verde).



Anexo B: Diferencias mínimas significativas de degradación y crecimiento en caldo luria y solución salina.

1. Diferencia minima significativa del porcentaje de degradacion de fenol en luria por las bacterias en la concentracion de:

A. 125ppm.

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
D12	3	0,431487	X
200(5)	3	2,31183	XX
200(4)	3	3,67935	XX
200(3)	3	4,19217	XX
D9	3	6,05115	XX
303(5)	3	7,09815	X
PSE	3	7,41867	X
D3	3	8,78619	X
D10	3	11,6922	X
D8	3	12,205	X
D4	3	12,9101	X
201(5)	3	14,1067	X

B. 250ppm

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
201(5)	3	0,0	X
PSE	3	0,0	X
D10	3	0,0	X
D9	3	0,0	X
200(3)	3	0,130274	X
200(5)	3	1,07044	XX
200(4)	3	1,49779	XX
D12	3	2,18156	XXX
303(5)	3	2,3525	XXX
D8	3	2,68369	XX
D4	3	3,12173	X
D3	3	4,56403	X

C. 500 ppm

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
303(1)	3	0,0	X
D3	3	0,0	X
D12	3	0,0	X
D9	3	0,0	X
200(5)	3	0,0	X
D4	3	0,0	X
200(3)	3	0,0	X
200(4)	3	0,0224017	X
PSE	3	0,0597949	X
D8	3	0,230735	X
D10	3	0,786291	X
201(5)	3	1,26172	X

2. Diferencia minima significativa del crecimiento de las bacterias en luria por las bacterias en la concentracion de :

A. 125ppm

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
303(5)	3	4,20667E8	X
201(5)	3	6,69667E8	X
Pse	3	6,93E8	X
D10	3	7,03333E8	X
D8	3	7,83E8	X
D12	3	8,96667E8	X
D9	3	9,36667E8	XX
D4	3	9,71333E8	XX
200(3)	3	1,01233E9	XX
200(4)	3	1,07E9	XX
200(5)	3	1,10333E9	X
D3	3	1,27E9	X

B. 250ppm

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
200(5)	3	2,28E8	X
303(5)	3	3,52E8	X
Pse	3	4,50333E8	X
D8	3	5,82E8	X
D10	3	6,37E8	XX
201(5)	3	6,95333E8	X
D9	3	8,23667E8	X
D12	3	8,47333E8	X
D4	3	9,12333E8	XX
200(4)	3	9,58333E8	X
D3	3	1,34667E9	X
200(3)	3	1,37667E9	X

C. 500ppm

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
303(5)	3	0	X
200(5)	3	1,03333E8	X
D9	3	2,93333E8	X
Pse	3	3,33333E8	X
D10	3	4,5E8	X
D8	3	5,1E8	X
D12	3	5,86667E8	X
201(5)	3	6,7E8	X
200(3)	3	7,3E8	X
200(4)	3	7,5E8	XX
D3	3	7,86667E8	X
D4	3	1,1E9	X

3. Diferencia minima significativa del porcentaje de degradacion de fenol en s/n salina por las bacterias en la concentracion de :

A. 125ppm de fenol.

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
200(5)	3	0,0	X
200(4)	3	4,99145	X
D10	3	50,9744	X
201(5)	3	51,4872	X
D9	3	64,9915	X
D8	3	68,9231	XX
303(5)	3	69,094	XX
PSE	3	70,4615	XXX
200(3)	3	75,0769	XXX
D3	3	77,2991	XXX
D4	3	81,2308	XX
D12	3	87,5556	X

B. 250ppm de fenol

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
200(3)	3	0,0	X
PSE	3	0,0	X
200(5)	3	0,358974	X
D12	3	0,529915	X
303(5)	3	0,700855	X
D8	3	4,97436	XX
D4	3	9,16239	XX
200(4)	3	10,1026	XX
D10	3	16,3419	X
D9	3	16,8547	X
D2	3	25,8044	X
201(5)	3	30,2735	X

C. 500ppm de fenol

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
201(5)	3	0,0	X
200(3)	3	0,0	X
303(5)	3	0,0	X
D8	3	0,0	X
PSE	3	0,0	X
D10	3	2,01709	XX
200(5)	3	2,18803	XX
D12	3	4,15385	XX
D9	3	5,05128	XX
D3	3	7,1453	X
200(4)	3	13,6838	X
D4	3	14,2393	X

4. Diferencia minima significativa del crecimiento de las bacterias en s/n salina en la concentracion de :

A. 125ppm de fenol

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
D12	3	1,83667E7	X
D3	3	4,72333E7	X
D10	3	4,83333E7	XX
D4	3	5,28E7	XX
201(5)	3	5,5E7	XX
200(5)	3	5,61333E7	XXX
303(5)	3	5,89E7	XX
D8	3	6,E7	XX
200(4)	3	6,39E7	XX
200(3)	3	6,56E7	X
D9	3	1,05667E8	X

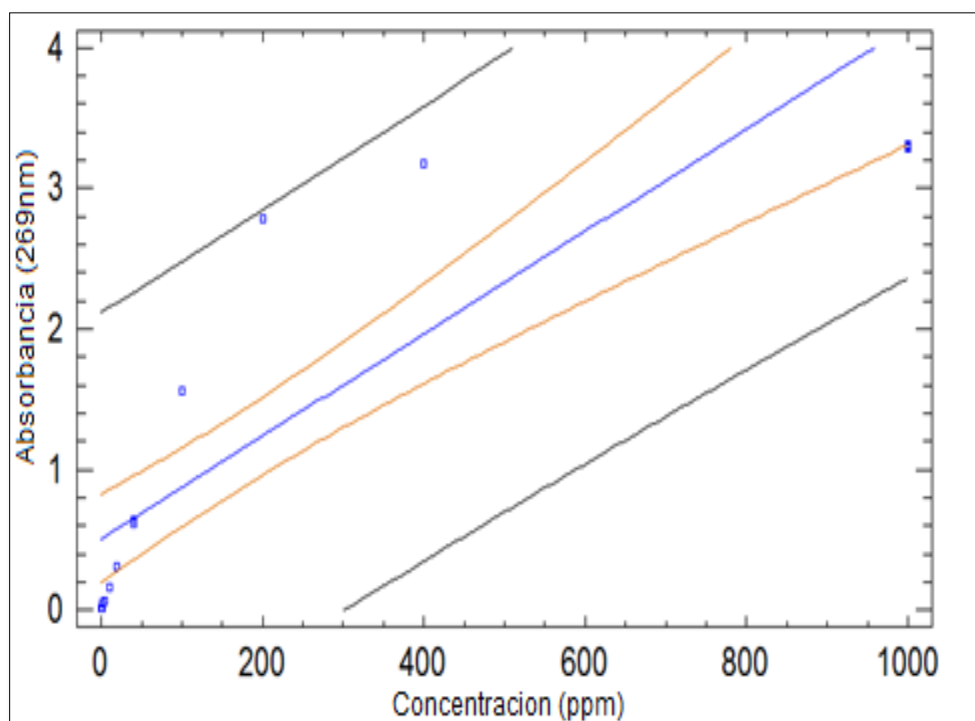
B. 250ppm de fenol.

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
D10	3	0,0	X
Pse	3	0,0	X
201(5)	3	0,0	X
D9	3	0,313333	XX
200(3)	3	0,325684	XX
200(5)	3	2,67611	XXX
200(4)	3	3,74449	XXX
303(5)	3	5,88124	XX
D8	3	6,70923	X
D4	3	6,94962	X
D3	3	11,4101	X

C. 500ppm de fenol

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
D4	3	0,0	X
D3	3	0,0	X
303(5)	3	0,0	X
D9	3	0,0	X
200(5)	3	0,0	X
200(3)	3	0,393462	XX
Pse	3	0,626667	XX
D8	3	1,15368	X
200(4)	3	1,21427	X
D10	3	4,04993	X
201(5)	3	6,5194	X

Anexo C: Curva de calibración para la cuantificación de fenol.



	SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Los suscritos:

LUIS ALFONSO MONTOYA SÁNCHEZ con C.C N° 1.110'479.564

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar ☒

No Autorizar ☐ Motivo: _____

La consulta en físico y la virtualización de mi OBRA, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

Fecha Versión 02: 04-11-2016

	SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable” y 37 “...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN XENOBIÓTICA POR MICROORGANISMOS DE SUELOS ARROCEROS TRATADOS CON PLAGUICIDAS EN EL TOLIMA

Título completo: Trabajo de grado presentado para optar al título de:

Biólogo

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Artículo publicado en revista:

- Capítulo publicado en libro:

- Conferencia a la que se presentó:

Fecha Versión 02: 04-11-2016


	SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: 19 Mes: Mayo Año: 2017

Autores:

Firma

Nombre:	<u>Luis Alfonso Montoya Sánchez</u>		C.C.	<u>1.110'479.564</u>
Nombre:	<u></u>	<u></u>	C.C.	<u></u>
Nombre:	<u></u>	<u></u>	C.C.	<u></u>
Nombre:	<u></u>	<u></u>	C.C.	<u></u>

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.

Fecha Versión 02: 04-11-2016